

# 博士論文

## 放射線影響による認知機能障害 に関する fMRI を用いた研究

阿部 欣史

要旨	6
はじめに	11

---

## 第一章 ラット海馬における Opto-fMRI 技術の確立

<b>1-1. 序論</b>	<b>15</b>
1-1-1. MRI とは	
1-1-2. fMRI とは	
1-1-3. Opto-fMRI	
1-1-4. fMRI 解析	
<b>1-2. 方法</b>	<b>21</b>
1-2-1. 動物	
1-2-2. 組織染色	
1-2-3. fMRI 撮像	
1-2-4. Opto-fMRI 解析	
1-2-5 統計解析	
<b>1-3. 結果</b>	<b>25</b>
<b>1-4. 考察</b>	<b>29</b>

---

## 第二章 ラットを用いた放射線照射による認知機能障害と海馬ネットワーク変化

<b>2-1. 序論</b>	<b>32</b>
2-1-1. 新生ニューロンと認知機能	
2-1-2. 放射線照射と認知機能	
2-1-3. rsfMRI	
2-1-4. rsfMRI 解析	

<b>2-2. 方法</b>	<b>39</b>
2-2-1. 動物	
2-2-2. 放射線照射	
2-2-3. 行動実験	
2-2-4. 免疫染色	
2-2-5. fMRI 撮像	
2-2-6. Opto-fMRI 解析	
2-2-7. rsfMRI 解析	
<b>2-3. 結果</b>	<b>43</b>
<b>2-4. 考察</b>	<b>52</b>

---

### 第三章 超高磁場 NMR 磁石を用いたマウス fMRI 技術の開発

<b>3-1. 序論</b>	<b>56</b>
3-1-1. MRI の原理	
3-1-2. MRI の構造	
3-1-3. 傾斜磁場コイルについて	
3-1-4. RF コイルについて	
3-1-5. シークエンスについて	
<b>3-2. 方法</b>	<b>63</b>
3-2-1. 傾斜磁場コイルの作製	
3-2-2. RF コイルの作製	
3-2-3. 14.1tesla MRI 装置の構築	
3-2-4. ファントムの作製	
3-2-5. MRI 撮像	
3-2-6. シグナル/ノイズ比の計測	
3-2-7. 前強調法による傾斜磁場コイルの調節	
3-2-8. rsfMRI	
<b>3-3. 結果</b>	<b>76</b>
<b>3-4. 考察</b>	<b>83</b>

---

## 第四章 マウスを用いた放射線照射による海馬ネットワーク変化

4-1. 序論	87
4-1-1. DTI	
4-1-2. VBM	
4-2. 方法	90
4-2-1. 動物	
4-2-2. 行動実験	
4-2-3. 免疫染色	
4-2-4. MRI 撮像	
4-2-5. rsfMRI 解析	
4-2-6. DTI 解析	
4-2-7. VBM 解析	
4-3. 結果	95
4-4. 考察	103

---

## 第五章 NPC 患者を用いた放射線照射に関する海馬ネットワーク変化

5-1. 序論	108
5-1-1. NPC 患者と放射線治療	
5-2. 方法	111
5-2-1. NPC 患者のルクルート	
5-2-2. MRI 撮像	
5-2-3. rsfMRI 解析	
5-2-4. DTI 解析	
5-3. 結果	115
5-4. 考察	121

---

結論	124
参考文献	127
略語一覽	138
謝辭	143

## 要旨

### 放射線影響による認知機能障害に関するfMRIを用いた研究

学籍番号 47-127301 細胞応答化学分野 阿部 欣史

#### 【背景・目的】

成体の海馬において新生ニューロンに関する研究が長年行われてきた。この海馬新生ニューロンは、海馬歯状回 (dentate gyrus; DG) に存在する神経幹細胞から分裂し、分化した新しいニューロンである。海馬は認知機能を司る脳領域であり、新生ニューロンは記憶機能の調節に関わっている。新生ニューロンのはたらきを調べるために、幹細胞が放射線照射に対する感受性が高いことを利用して、新生ニューロンを除去するための実験的方法として、動物個体に放射線照射する方法が用いられてきた。一般的にヒトにおいても、がん治療のため頭部へ放射線を照射した際に、その副作用として認知機能障害が生じる事が知られている。その原因の一つとして海馬新生ニューロン数の低下が挙げられる。がん治療において、その副作用を軽減させる事、また回復させる事はとても重要な課題となる。

頭部への放射線照射により認知機能障害が見られる時、新生ニューロン数の低下により、海馬ネットワークにおいて、何らかの影響があると考えられる。そこで、本研究の目的として、頭部への放射線照射によって、海馬ネットワークがどのように変化するかを調べる事とした。

脳内のネットワークや神経活動を非侵襲的に計測する方法のひとつに functional magnetic resonance imaging (fMRI) がある。fMRI は神経活動に伴う血流変化を神経活動として捉え、間接的にネットワークや神経活動を評価する方法である。従来、fMRI の研究はヒトを対象とした研究が多かったが、fMRI 技術の発展に伴いラット及びマウスなどの小動物における fMRI 研究も可能となった。これにより、ヒトだけではなく小動物を用いた非侵襲的な脳機能研究が可能となった。

本研究では、小動物の研究に fMRI を導入することにより、まずは、頭部に放射線を照射したラット及びマウスを用いて、放射線照射による認知機能変化と海馬ネットワーク変化に関する研究を行った。そして、動物実験の結果を踏まえて、頭部への放射線治療を受けたがん患者を研究対象として、放射線治療後の海馬ネットワーク変化を調べた。

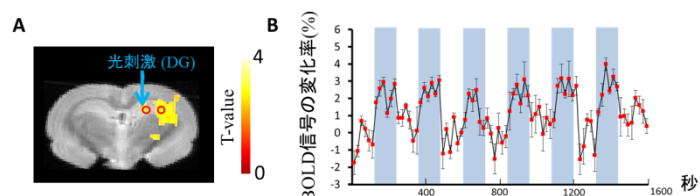
#### 【結果・考察】

##### 1. ラットの海馬における Opto-fMRI 技術の確立

海馬の神経活動を fMRI により計測するためには、何らかの方法により海馬の神経活動を誘導する必要がある。一般的な手法として、実験動物であれば、金属電極を用いた電気刺激によって神経活動の誘導を行う。しかし MRI 内では高磁場な環境にあるため、金属電極

の使用は難しい。そこで Optogenetics を用いて神経活動の誘導を行った。光感受性のイオンチャンネルである channelrhodopsin 2 (ChR2) が海馬に発現しているトランスジェニックラット (Tg ラット) を用いて、光刺激により、海馬の神経活動を誘導し、その神経活動を fMRI により、解析した。この手法を Opto-fMRI と呼ぶ。新生ニューロンが存在する DG に光ファイバーを挿入し、光刺激を行い、DG の神経活動を誘導した。fMRI 実験は 4.7 tesla の MRI 装置を用い、

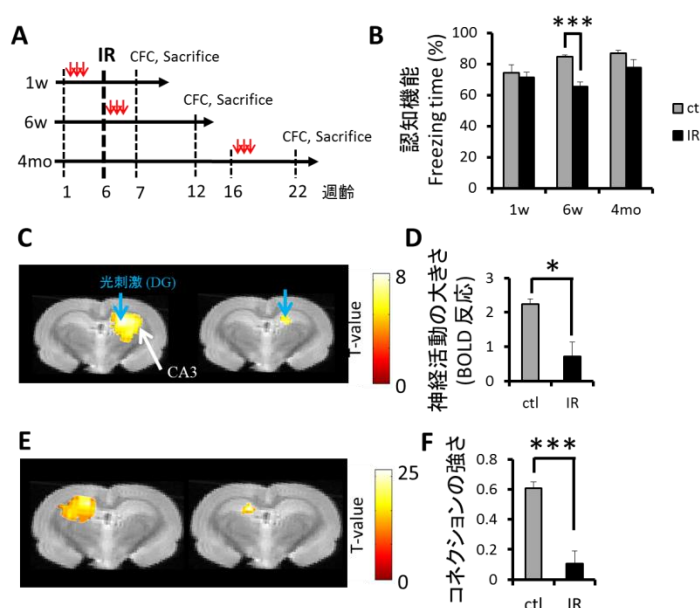
$\alpha$ -chlorarose 麻酔下で行った。その結果、DG に存在するニューロンの投射先である CA3 領域において、光刺激に伴う神経活動を fMRI により解析する事に成功した (Fig. 1)。次に、この手法を用いて、放射線照射による海馬神経活動の変化を調べた。



**Fig. 1** ラット海馬におけるOpto-fMRI (A) DGを光刺激した時におけるOpto-fMRIの解析結果。(B) 光刺激に伴うCA3におけるBOLD信号の経時的な変化。青い領域は光刺激を示す。

## 2. ラットを用いた放射線照射による認知機能障害と海馬ネットワーク変化

始めに、放射線照射による認知機能障害が起こる時期を特定するため、認知機能の経時的な変化を調べた。認知機能の評価は contextual fear conditioning test (CFC) を用いた。CFC とは電気ショックによる恐怖記憶を空間と関連付けて記憶しているのかを調べる試験である。6 週齢のラットの頭部だけに放射線(ガンマ線)を 10Gy 照射し(胴体部は鉛で保護)、照射 1 週後、6 週後、4 ヶ月後に CFC を行った (Fig. 2A)。その結果、放射線照射 6 週後で認知機能障害がみられ、4 ヶ月後には回復している事が分かった (Fig. 2B)。新生ニューロン数を比較した結果でも、放射線



**Fig. 2** ラットによる海馬ネットワークの評価

(A)実験のタイムスケジュール。赤矢印はBrdUの投与を示す。(B)放射線照射1週(1w)、6週(6w)、4ヶ月後(4mo)における認知機能の評価。Freezing timeが高い程、認知機能が高い事を示す。(C)非照射群(左パネル)と照射群(右パネル)における右DGを光刺激した時の海馬神経活動を示す。(D)DGを光刺激する事で誘導されたCA3領域の神経活動の強さ(BOLD反応の強さ)を比較した。(E)非照射群(左パネル)と照射群(右パネル)における左DGとのコネクシオンがある領域を示す。(F) DGとCA3領域のコネクシオンの強さを比較した。\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test)

照射 6 週間後だけで新生ニューロン数が減少する事が分かった。

これらの実験より、放射線照射 6 週間後では新生ニューロン数が減少し、認知機能障害が起こる事が観察された。さらに放射線照射 4 ヶ月後では新生ニューロン数の回復と、認知機能障害からの回復が観察された。これらの結果より、放射線照射による認知機能障害は一時的な障害であり、時間経過と共に回復する事が分かった。また放射線照射 6 週間後に認知機能障害が見られた事は、先行研究にある 4-6 週齢新生ニューロンが認知機能に関与しているという事から考えて、放射線照射による 4-6 週齢新生ニューロン数の減少により認知機能障害が引き起こされたという事が強く示唆された。

放射線照射 6 週間後の海馬ネットワークに着目し、海馬神経活動の変化を Opto-fMRI により解析した。その結果、DG で誘導された神経活動は、放射線照射により、CA3 領域において、減少していた (Fig. 2C, D)。さらに、DG と CA3 間におけるネットワークの強さを調べるため、fMRI 技術の一つである resting state fMRI (rsfMRI)を行った。rsfMRI は安静時における BOLD 信号の同調率を解析する事で領域間におけるコネクシオンの強さを調べる事が出来る。その結果、CA3 領域において DG とのコネクションが減少している事が分かった (Fig. 2E, F)。

以上の結果から、放射線照射 6 週間後では、認知機能障害と新生ニューロン数の減少が見られ、この時、DG-CA3 間のネットワークは減少する事が示唆された。

### 3. 超高磁場 NMR 磁石を用いたマウス fMRI 技術の開発

上記の 4.7 tesla MRI 装置を用いた fMRI 実験では、空間分解能の低さのため、人において応用可能な結果を得るには至らなかった。海馬と他の領域のネットワーク変化を評価する事ができれば、ヒトの fMRI 研究に応用する事ができる。このためには、高磁場 MRI による高分解能と高信号ノイズ比が必要となる。そこで汎用性が高く、磁場強度が高い nuclear magnetic resonance (NMR)磁石を利用する事を考えた。しかし、NMR 磁石ではサンプルを入れるための空間が極端に小さくなるため、ラットやマウスを入れる事は出来ない。そこでマウスを入れる事が出来る傾斜磁場コイルと radio frequency (RF)コイルを作製する事により、超高磁場 NMR 磁石 (14.1 tesla)を用いたマウス fMRI 実験が可能になるのではないかと考えた。マウスを入れる事が出来る傾斜磁場コイルと RF コイルを作製した事で (Fig. 3A, B)、マウスの機能画像 (fMRI 解析に使用する MRI 画像)の撮像に成功した。これにより、NMR

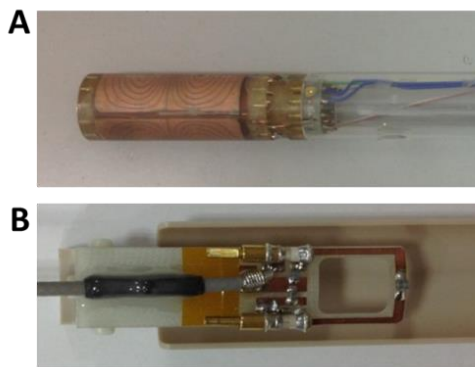


Fig. 3 作製したコイル  
(A) 作製した傾斜磁場コイル。(B)作製したRFコイル



磁石を用いた超高磁場 MRI 装置を構築する事ができた。

#### 4. マウスを用いた放射線照射による海馬ネットワーク変化

次に構築した MRI 装置を用いて、ラット rsfMRI 実験結果の検証を行った。当研究室の先行研究により、マウスにおいても放射線照射後 6 週間後のみで認知機能障害と新生ニューロン数の減少が観察された。そこで、マウスの実験においても放射線照射 6 週間後に着目し、新生ニューロン数が減少している時の海馬ネットワーク変化を rsfMRI により解析した。新生ニューロンの影響を最大限に評価するため、1 週齢マウスを用いた。さらに、一般的な放射線治療に用いられているフラグメント照射を用いた。マウスの頭部に放射線 10 Gy (2 Gy×5)を照射し、その 6 週間後に rsfMRI を行った。

始めにラットの実験と同様に、認知機能障害と新生ニューロン数の減少が起きている事を確認した。そして、DG とのコネクションの強さを比較した結果、放射線照射により CA3 において、DG とのコネクションの強さの減少が観察された (Fig. 4A, B)。さらに DG と前頭前野のネットワークも減少している事が分かった (Fig. 4C)。前頭前野は海馬と共に認知機能に関与している領域である。また、前頭前野と同様に海馬と密接に繋がっており、さら

に認知機能に関与している中隔野の領域においても、コネクションの強さの減少が観察された。

以上より、マウス頭部への放射線照射によって、海馬内 (DG-CA3)のネットワークと海馬外 (海馬-前頭前野、海馬-中隔野)のネットワークが減少する事が示唆された。

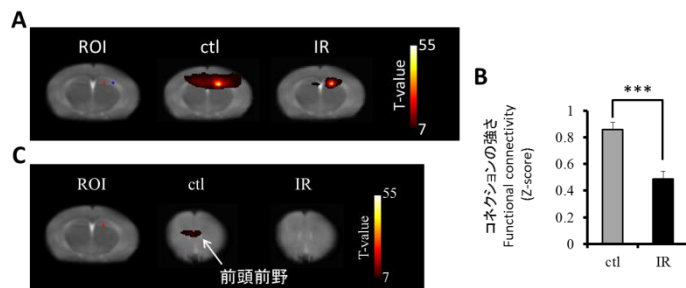


Fig. 4 マウスによる海馬ネットワークの評価 (A)非照射群 (ctl)と照射群 (IR)におけるDG (赤いROI)とのコネクションがある領域を示す。(B)DGとCA3 (青いROI)とのコネクションの強さを比較した。(C)非照射群 (ctl)と照射群 (IR)におけるDG (赤いROI)とのコネクションがある前頭前野の領域を示す。\*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test)

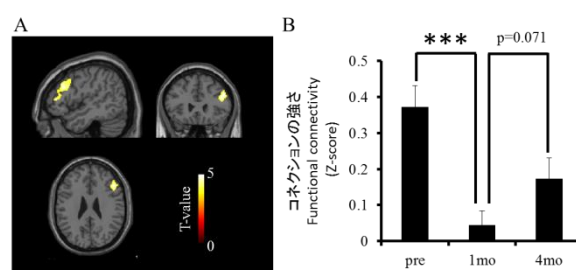
#### 5. 頭部への放射線治療を受けたガン患者の海馬ネットワーク変化

頭部への放射線治療による認知機能への影響を調べるために、本研究では上咽頭ガン (nasopharyngeal carcinoma; NPC)患者の協力を得て、研究を行った。この患者の放射線治療では放射線照射領域が海馬前方まで及ぶ事から、高頻度に認知機能障害が発生する。動物実験の結果から、NPC 患者の海馬と前頭前野のネットワークに着目して、rsfMRI により海馬ネットワークの解析を行った。

本研究は高雄医科大学 (台湾)との共同研究により行った。NPC 患者のリクルート、患者の治療、認知機能検査、MRI 撮像は高雄医科大学の共同研究者が行った。著者は MRI 解析を担当した。本研究では、16名の NPC 患者の協力を得た。

始めに、放射線治療前 (pre) に MRI 撮像を行った。次に放射線治療 (1 日 2 Gy の照射を 35 回) を約 7 週間かけて行った。治療終了後から 1 ヶ月後 (1mo) と 4 ヶ月後 (4mo) に MRI 撮像を行った。MRI 撮像は 3 tesla の MRI 装置を用いて rsfMRI を行った。

放射線照射範囲に海馬前方が含まれていることから、海馬前方に ROI を置き、海馬前方とのコネクション解析を行った。その結果、1mo では前頭前野において、海馬前方とのコネクションが減少している事が分かった (Fig. 5A, B)。この結果から、マウスの実験と同様に、放射線治療によって、海馬と前頭前野におけるコネクションが減少する事が示唆された。



**Fig. 5 NPC患者における海馬ネットワークの評価**

(A)海馬前方のROIを置き、FC解析を行った後、preに比べ1moでROIとのコネクションの強さが減少している領域を示す。(B)海馬前方と前頭前野のコネクションの強さを示す。\*\*\* $p < 0.001$  (paired t-test)

## 【結論】

動物実験の結果から、放射線照射 6 週間後では、認知機能障害と新生ニューロン数の減少が見られ、この時、海馬内のネットワーク (DG-CA3) と海馬外のネットワーク(海馬と前頭前野、海馬-中隔野)が減少する事が分かった。この変化には新生ニューロンが関与している可能性が高いと思われる。また NPC 患者でも動物実験と同様に海馬と前頭前野のネットワーク変化が観察された。これらの結果から、放射線照射によって新生ニューロンが減少する事により、海馬ネットワークが変化し、そして認知機能に影響が出るのではないかと推測される。この事から、新生ニューロンの減少を抑制・回復する事ができれば、放射線照射による副作用を軽減できるのではないかと考えられる。本研究で得られた結果が、放射線治療における副作用の改善に貢献できる事を期待する。

## はじめに

現在の日本において、病気による三大死因の一つにがんがある。さらに高齢化に伴い、高齢者におけるがん患者の増加が懸念される。多くの研究者や医師がこのがんを治療しようとしているが、現状ではがんを完全に治癒させる事は難しい。特に脳腫瘍では他のがんより治療が難しいと言われている。それは脳が我々にとって未知な領域であり、完全に理解されていない領域だからである。

脳腫瘍の治療法として、外科的な手術、抗がん剤治療、そして放射線治療が挙げられる。現在では、これら 3 つの治療法を混合して行う事が多くなっている。しかし、脳に転移した場合など外科的手術を行うのが困難な領域に腫瘍ができた場合、放射線治療を主にした治療法が選択される場合がある。この放射線治療の副作用として、**quality of life (QOL)**の低下が挙げられる。腫瘍ができる領域毎に様々な脳機能に関する副作用が見られる。言語野に腫瘍ができれば言語障害が、運動野にできれば運動障害が見られる。認知機能に関与している領域に放射線があたれば、認知機能障害が見られる。本研究ではこの認知機能障害に焦点をあて、研究を行った。

放射線治療による認知機能障害の原因として、脳内神経細胞のネクローシス、白質損傷、そして海馬における新生ニューロンの減少が挙げられる。放射線は細胞に物理的なダメージを与える事でネクローシスを引き起こす (Tsui et al., 2001; Chen et al., 2011)。また、放射線照射により白質にもダメージが与えられる (Wang et al., 2009; Wang et al., 2013)。白質繊維はシュワン細胞やオリゴデンドロサイトによりミエリンを形成しており、このミエリンは神経伝達のを早める跳躍伝導に関わり、神経伝達の調節を行っている。放射線照射によって神経細胞のネクローシスや白質損傷が認知機能に関与する領域で起こった時、認知機能障害が見られる。また、放射線は分裂細胞にも影響を与える事が知られている。放射線は DNA に障害を起し、DNA 複製時に DNA のコピーミスを引き起こす。これにより、アポトーシスが誘導され、細胞死に繋がる (Peissner et al., 1999; Tada et al., 2000)。このため、放射線照射は分裂細胞に大きな影響を与える。新生ニューロンは海馬の歯状回 (dentate gyrus, DG) に存在する神経幹細胞から分裂、分化する。この分裂時において放射線が照射されると、アポトーシスが誘導され、新生ニューロンの減少に繋がる (Rola et al., 2004; Saxe et al., 2006; Kitamura et al., 2009)。海馬は記憶形成の中核領域であり、認知機能において非常に重要な領域である。また、新生ニューロンも海馬依存的な認知機能に寄与している。これらの理由から、放射線治療後に認知機能障害が見られる事が分かっている (Taphoorn et al., 2004; Li et al., 2008)。

現在の放射線治療では様々な面で治療法の改善がなされ、放射線照射により誘導される、ネクローシスや白質損傷を抑制することが可能となった。これは放射線照射領域を限定する事により、正常な細胞を傷つけない事が可能となったきたからである。現在では定位放射線照射法により、予め得られた脳の位置情報から、適切な照射領域や照射角度を決める

事が出来るようになった。また放射線照射線量の検討により、正常な細胞に出来るだけ影響をえない照射線量が検討されてきた。現在の放射線治療では 2 Gy 以下の断片照射（フラグメント照射）が用いられる事が多い。照射回数を複数にする事により、正常細胞へのダメージを減らす事が出来るためである。

しかし、放射線治療による海馬における新生ニューロンへの影響は不明確である。動物実験の結果から、頭部に 2 Gy 以下の放射線を照射することで、新生ニューロンの低下が見られる事が報告されている(Rivera et al., 2013)。しかし、ヒトにおける新生ニューロンへの影響を評価する事は難しい。それはヒトにおいて新生ニューロン数を評価する方法として非侵襲的な方法しか確立されていないためである。このため、放射線治療と新生ニューロンの関係はまだ不明確な部分が多い。しかし、新生ニューロンのアポトーシスを抑制する事により、認知機能の増加が見られる事が動物実験の結果から分かっている (Sahay et al., 2011)。またアルツハイマー病等の認知機能に関する病気の治療薬としても、新生ニューロンをターゲットした薬が存在している。この事から、新生ニューロンは放射線治療の副作用を軽減させる、または回復させるためのターゲットとなるのではないかと考えられる。ヒトにおいて、放射線治療と新生ニューロンの関係は不明確な部分もあるが、放射線治療や副作用の改善において今後の治療における可能性があると考えられる。

本研究では、この放射線治療における副作用としての認知機能障害に焦点をあて研究を行った。その認知機能障害の原因の一つとして新生ニューロンに着目して研究を進めた。新生ニューロンは認知機能に大きく関与している事が動物実験の結果から分かっている (Rola et al., 2004; Saxe et al., 2006; Kitamura et al., 2009)。また海馬ネットワークにも大きな影響を与える事も知られている (Zhao et al., 2006; Ge et al., 2007; Toni et al., 2008)。そこで放射線照射により、新生ニューロン数が低下する事で海馬ネットワークに何らかの影響を与えるのではないかと仮説を立てた。また、これにより認知機能障害が起こるのではないかと考えている。これまでの研究により、新生ニューロンの機能に関して上記のように様々な事が分かってきた。しかし、新生ニューロンが海馬ネットワークにおいてどのような役割を持ち、海馬ネットワークに対して、具体的にどのように寄与しているのかはあまり分かっていない。そこで、本研究では頭部への放射線照射によって引き起こされる認知機能障害に対して、海馬ネットワークがどのように変化するかを調べる事を目的として研究を行った。

非侵襲的に海馬のネットワークを調べる方法として **functional magnetic resonance imaging (fMRI)**がある。fMRI は脳内の血流変化を神経活動の変化として捉え、脳内の神経活動やネットワークを評価する事が出来る技術である。fMRI の技術には二つの手法がある。

一つ目は **tasked fMRI** である。これは MRI 装置内で **task (課題)**を課し、その課題に応じて神経活動が誘導された脳領域を評価する方法である。本研究では **Optogenetics** の技術を用いて海馬の神経活動を誘導した。放射線照射後、この誘導される神経活動の変化を fMRI により評価した。この **Optogenetics** と fMRI を合わせた技術を **Optogenetics-fMRI**

(Opto-fMRI)と呼ぶ。

二つ目には resting state fMRI (rsfMRI)がある。rsfMRIは none-tasked fMRI を呼ばれ、tasked fMRI とは違い、課題を課さず、安静時における BOLD 信号 (fMRI 信号)を計測する方法である。この rsfMRI により、領域間のコネクションの強さを調べる事ができ、脳内のネットワークを評価する事が可能である。本研究では、rsfMRI を用いて、放射線照射による海馬のネットワーク変化を評価した。

ヒトの脳研究において、倫理的な問題から侵襲的な研究は難しく、MRI が唯一の評価方法となっている。さらに fMRI 技術の発展により、マウスやラット等の小動物を用いた fMRI 研究が行えるようになってきた。神経新生の研究においても、他の研究グループではヒトの神経新生を評価するために MRI を用いている (Manganas et al., 2007; Pereira et al., 2007)。しかし、動物実験の結果から、ヒトの情報を推測するという方法を取っている。本研究においても、動物実験から得られた結果を基に、臨床研究に応用する事が出来るのではないかと考えている。

本研究では、頭部への放射線照射により新生ニューロンが減少し、認知機能障害が起きている時、海馬ネットワークがどのように変化するのかを fMRI により、明らかにする事を目的として実験を行った。まず始めに、海馬神経活動を評価するための技術として、ラット海馬における Opto-fMRI 技術の確立を行った。そして、放射線照射により、新生ニューロンが減少した時、海馬ネットワークが変化するのかを調べるため、新生ニューロンの増殖に障害を起こすのに十分な量の放射線を照射したラットを用いて実験を行った。次に放射線治療で用いられているフラグメント照射を行ったマウスを用いて、臨床研究に繋げるための基礎実験を行った。そして最後に、動物実験の結果を臨床研究に応用するため、放射線治療を行ったがん患者を用いて、臨床研究を行った。

## 第一章

### ラット海馬における Opto-fMRI 技術の確立

## 1-1. 序論

第一章では、海馬における神経活動を調べるために Opto-fMRI 技術の確立を目的とした。そのため、ラットを用いて、海馬の神経活動を光刺激により誘導し、その誘導された神経活動を fMRI により解析した。

### 1-1-1. MRI とは

MRI は核磁気共鳴現象 (nuclear magnetic resonance, NMR) を利用し、原子核の信号を画像化する装置である。NMR は、原子核が静磁場に置かれた時、その原子核と共鳴する周波数の電磁波と相互作用する現象の事である。MRI では特にプロトンに着目し、プロトンの NMR 信号を利用して画像を作製する。

MRI の一番の特徴として非侵襲性のイメージング技術が挙げられる。神経科学におけるイメージング技術の多くは侵襲性を伴う事から、MRI の非侵襲性イメージング技術が重要視されている。特にヒトを用いた神経科学の研究では MRI は欠かせない技術になっている。二つ目の特徴として実験方法の多様性が挙げられる。MRI はひとつの装置から様々な情報を得る事が出来る。その多様性を生み出す MRI の撮像方法には次の様な方法がある。一般的な解剖画像の撮像(structural MRI)、神経活動の計測(functional MRI)、水の拡散情報の計測(diffusion MRI)、代謝物の計測(MR spectroscopy)、血管画像の撮像(MR angiography)などが挙げられる。本研究では神経活動や脳内ネットワークの解析が可能な functional MRI (fMRI) に着目し、実験を行っている。

### 1-1-2. fMRI とは

fMRI は、1990 年に Ogawa らによって発見された blood oxygenation level-dependent (BOLD) 効果による BOLD 信号を計測する方法である (Ogawa et al., 1990)。BOLD 効果とは以下の通りである。通常 fMRI において、プロトンの  $T_2^*$  ( $T_2$  スター、第三章 3-1-5 の項目で詳しく述べる) 値を計測している。血管内のデオキシヘモグロビンは常磁性体の性質をもっているため、磁場の均一性を乱しやすく、デオキシヘモグロビン存在下ではプロトンの  $T_2$  スター値を低下させてしまう。しかし、脳活動に伴う局所的な血流の増加により、デオキシヘモグロビンの量が減少すると、安静時と比べて相対的にプロトンの  $T_2$  スター値が増加する。これが BOLD 効果である (Fig. 1)。つまり fMRI は脳活動と局所脳血流を結び付けて神経活動を間接的に可視化する技術である。

fMRI の研究はヒトを対象とした脳機能マッピング研究や健常者と疾患患者の BOLD 信号を比較する事で得られる情報を応用した医療研究の分野で発展してきた。しかしヒトを対象とした実験系では破壊実験や遺伝子操作モデル、疾患モデルへの応用が困難なため、

マウス、ラット、サルなどの実験動物を用いた fMRI 研究の重要性が高まってきている。

fMRI の利点として、動物を殺さずに生きた状態で脳全体の活動を測定する事が可能である事が挙げられる。MRI 以外にも脳活動を測定する方法として、電気生理学的な手法であるパッチクランプ法や脳波計測、また Positron Emission Tomography (PET)、Computerized Tomography (CT) などがある。パッチクランプ法は、脳を取り出し、急性スライスを作成し、そのスライス上の細胞に電極を刺す事で、神経細胞の膜電位を測定する方法であるが、生きた状態での測定は非常に難しい。また脳波の計測はパッチクランプ法に比べると非侵襲性は高いが、電極を刺した付近の脳活動しか計測ができない点が欠点である。また PET や CT は分解能の低さや放射線の影響が懸念されている。これらの点で fMRI は脳活動を測定する上では非侵襲的であり、放射線も使用せず、脳全体を計測できるとても優れた技術である。

fMRI の手法には大きく分けて 2 種類の手法がある。一つ目は **tasked fMRI** である。一般的な fMRI はこの **tasked fMRI** に当たる。これは MRI 装置内で **task** (課題) を課し、その課題に応じて神経活動を誘導し、脳領域の活動を評価する方法である。課題を課す時間と課題を課さない時間 (安静状態の時間) を交互に繰り返し行い、課題を課していない時間に比べ、課題を課した時にどの脳領域でどれだけ **BOLD** 信号が上昇したかを統計学的に算出する方法である。二つ目には **resting state fMRI (rsfMRI)** がある。**rsfMRI** は **none-tasked fMRI** を呼ばれ、一般的な fMRI とは違い、課題を課さず、安静時における **BOLD** 信号を計測する方法である。詳しい内容は第二章で述べる。

### 1-1-3. Opto-fMRI

**Opto-fMRI** は **tasked fMRI** に分類され、**rsfMRI** とは違い、直接神経活動を誘導し、その神経活動を計測する。神経活動を計測するためには、神経細胞を刺激し、神経活動を誘導する必要がある。通常は金属電極を脳内に挿入し、電気刺激を行う事により神経活動を誘導する。しかし MRI では高磁場な環境にあるため、金属電極は使用出来ない。MRI でよく使用されているタングステンや白金などの金属を使用する事も可能ではあるが (Canals et al., 2008; Angenstein et al., 2007, 2009)、MRI の均一磁場内に金属を持ち込めば、磁場が不均一になり、MRI のシグナルを阻害してしまう。これらの問題を解決するために、**Optogenetics** (光遺伝学) という新しい技術を用いた。

**Optogenetics** は 2006 年に開発された神経科学の分野においては新しい技術である (Deisseroth et al., 2006; Arenliel et al., 2007; Gradinaru et al., 2010)。**Optogenetics** ではクラミドモナスから抽出された **Light-gated non-selective cation channel** である **channelrhodopsin 2 (ChR2)** を用いる。この **ChR2** を神経細胞に発現させ、青色の光を当てると、**ChR2** のチャンネルが開き、陽イオンが細胞内に流入してくる。これにより神経細胞の膜電位が変化し、そして次々に電位依存的なナトリウムイオンチャンネルが活性化して、



活動電流が発生する。つまり **Optogenetics** とは神経細胞に **ChR2** を発現させ、光刺激により神経活動を人為的に操作する技術である。そして、その誘導された神経活動を **fMRI** により解析する方法が **Optogenetics-fMRI (Opto-fMRI)** である。**Opto-fMRI** は観察したい領域を光刺激する事で、その領域の活動とネットワークを解析する事が出来る。

**Opto-fMRI** の技術は 2010 年に 1 報 (Lee et al., 2010)、2011 に 2 報 (Desai et al., 2011 ; Kahn et al., 2011) の報告があるように最新の技術である。今までの 3 つの報告では、Lee らは **ChR2** をアデノウイルスにより導入したマウスで運動野と視床のネットワークを研究している。Desai らと Kahn らでは **ChR2** が脳全体に発現しているマウスを用いて覚醒状態 (無麻酔状態) での感覚野のネットワークについて研究している。

#### 1-1-4. **fMRI** 解析

**fMRI** 解析において重要な事は前処理と呼ばれている作業である。前処理の全体的な流れは Fig. 2 に示した。**fMRI** データの前処理を行う解析ソフトとして、一般的に使用されている **Statistical Parametric Mapping (SPM)** がある。**SPM** は人の脳を機能的に解析するために作られたソフトであり、**fMRI** の研究では世界中で使用されている。本研究では、これをラットやマウスにも応用して **fMRI** 解析を行った。大まかな解析の概要を以下に示す。始めに個体毎に解析を行い、最後に集団的に統計解析を行う。個体解析では前処理により集団解析を行うための処理を行う。集団的統計解析では個体間で特異的にコネクションがある領域や活動している領域を統計学的に算出する。

前処理の作業項目には **realignment**, **slice timing**, **co-register**, **normalize**, **smoothing** がある。この前処理について解説する。**fMRI** 撮像中、動物の脳は呼吸などにより多少は動いている。そのため脳の動きを補正するために一番始めの脳画像に位置を補正する **realignment** の処理を行う。**realignment** は横(X 軸)、縦(Y 軸)、高さ(Z 軸)、**X・Y・Z** 軸のそれぞれを軸とした回転の 6 つのパラメータにより処理される。**slice timing** はスライス間の撮像時間のズレを補正する。例えば、全体脳を 10 スライスとして 3 秒で撮像するとする。1 スライスに掛かる撮像時間は 0.3 秒となり、始めのスライスを撮像してからと最後のスライスの撮像が始まるまで 2.7 秒のズレが生じる。このスライス間の時間的なズレを補正している。**co-register** は **normalize** を行うための、解剖画像と機能画像 (**fMRI** 画像) の位置情報の擦り合せを行う。解剖画像と機能画像では画像の中心位置や **voxel** サイズが異なるため、次に行う **normalize** で誤差が生じてしまう。これを防ぐために解剖画像と機能画像 (**fMRI** 画像) の位置情報を合わせる必要がある。**co-register** の作業精度により、**normalize** の正確性が変わってくる。**normalize** は集団解析を行うために脳画像を標準脳(**template**) に合わせる事である。脳画像を **template** に合わせる事により、脳の形状や容積における個体差を無くし、集団解析を可能にしている。**normalize** は **realignment** の 6 つのパラメータの他に拡大・縮小の 2 つのパラメータを合わせて 8 つのパラメータにより処理される。まず、解

剖画像を **template** に **normalize** する。この時に得られた 8 つのパラメータを用いて機能画像を **template** に **normalize** する。前処理の最後の行程である **smoothing** はガウシアンフィルターを用いて **voxel** 間の平滑化を行う。これにより各 **voxel** が単独ではなくなり、隣り合う **voxel** 間が関連付けられ、さらにシグナル/ノイズ比 (**signal-noise ratio, SNR**)が上昇する。

**template** に関して、ヒトでは世界中で用いられている **template** が存在している。さらに、ヒトの脳は座標系として認識する事も可能となり、座標と脳領域は結び付いている。ヒトにおける座標系は二つあり、**Montreal Neurological Institute (MNI)**座標系と **Talairach** 座標系がある。SPM では **MNI** 座標が用いられている。しかし、マウスやラットにおいては世界中で共通で使用されている **template** や座標系は存在していない。そこで本研究ではラットやマウスの **template** を作製する事から行った。**template** を作製するにあたり、SPM 内にある **diffeomorphic anatomical registration through exponentiated lie algebra (DARTEL)**プログラムを用いて作製した。これは何個体もの解剖画像から平均画像を作製するプログラムである。

前処理後には、一般線形モデルを用いて、**voxel** 毎に統計処理を行う。**tasked fMRI** のような **fMRI** の統計解析では、課題による神経活動の増加を統計学的に個体毎に検出する。光刺激により有意に **BOLD** 信号が上昇している **voxel** を求める。まず始めに光刺激プロトコルに従い、光刺激の **on/off** を **SPM** デザインマトリクスに示す。この **SPM** デザインマトリクスに従って、各 **fMRI** 画像を光刺激 **on** にしている時の画像と **off** にしている時の画像に区別する。光刺激 **on** にしている時の方が **off** にしている時よりも統計学的に有意に **BOLD** 信号が増加している **voxel** だけを抽出し、統計値である **t** 値を用いた **t** コントラストマップを作成する。この **t** コントラストマップを予め撮像しておいた解剖画像の上に重ね合わせる事で、どの領域で光刺激によって誘導された神経活動が高まっているのかを判断できる。この **t** コントラストマップの作成を各個体で行い、それぞれの **t** コントラストマップを作成する。集団解析は作成された **t** コントラストマップを用いて、個体間で特異的に反応している領域を求める。

統計解析において、多重比較補正による統計処理も行う事が出来る。多重比較補正において各 **voxel** は単独ではなく何らかの関係性があるものとして考え、隣接する **voxel** 情報を踏まえて統計処理を行う。多重比較補正を用いて統計処理を行った場合、検定は厳しくなり有意な **voxel** を得られる確率は低くなってしまいが、信頼性はかなり高くなる。一般的に多重比較補正を行って統計処理をした場合は "**corrected**"、多重比較補正を行わない場合は "**uncorrected**"と表示される。これら全ての解析行程において、**voxel** 毎に解析を行う事から **voxel-based analysis** と呼ぶ事もある。

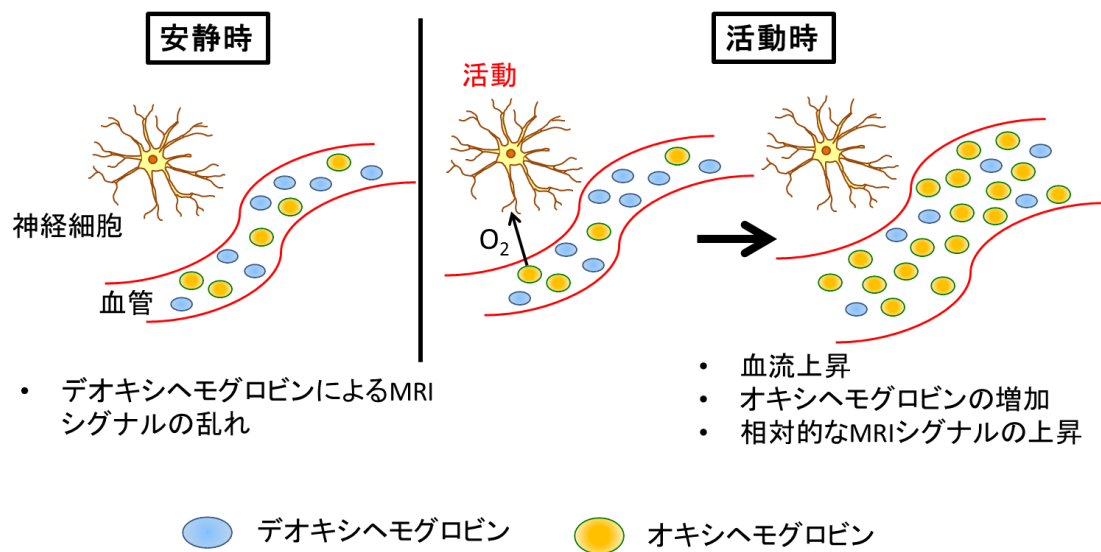


Fig. 1 BOLD 効果について

血管内にはデオキシヘモグロビンとオキシヘモグロビンが存在している。デオキシヘモグロビンは常磁性体の性質があり、磁場を乱し、fMRI 信号 (T2 スター値) を低下させるたつきがある。オキシヘモグロビンは反磁性体であるため、磁場には影響を与えない。神経細胞の活動に伴い、酸素の消費が増加する。これにより、局所血流が増加し、オキシヘモグロビンの量が増加する。これにより、デオキシヘモグロビンの相対量が減少する事で、磁場の乱れが小さくなり、安静時と比べ MRI 信号が増加する。この事を BOLD 効果という (Ogawa et al., 1990)。

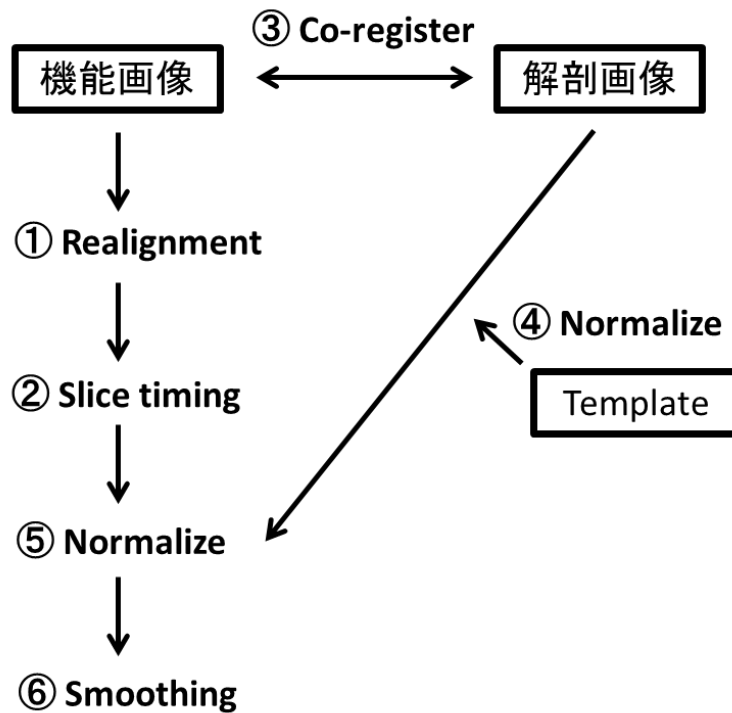


Fig. 2 前処理の流れ

機能画像 (fMRI 画像)を用いて realignment を行い、動体補正を行う。次に slice timing により、スライス間の時間補正を行う。次に機能画像と解剖画像で co-register を行い、位置情報の擦り合せを行う。解剖画像と標準脳 (template)を normalize し、この時の補正パラメータを用いて機能画像を template に normalize する。そして smoothing を行い、ノイズを除去する。ここまでを前処理という。

## 1-1. 方法

### 1-2-1. 動物

12 週齢の Wistar ラットをバックグラウンドとした Thy1.2 プロモーター下流で ChR2 と Venus の融合タンパク質が発現するトランスジェニックラット（東北大学大学院生命科学研究所八尾寛先生、福井大学医学部深澤有吾先生からのご提供; Tomita et al., 2009）を用いた。このラットは ChR2 と Venus が脳全体の神経細胞に発現している（Tomita et al., 2009）。また、グリア細胞には発現していない事が確認されている。ラットの飼育・実験は東京大学動物実験実施マニュアルに基づいて行った。

トランスジェニック(Tg)ラットの系統を維持するため、ラットの尾から DNA を抽出し、PCR 法により目的の遺伝子を持ったラットを判断した。3 週齢以上のラットの尾を 1 cm 切り取り、proteinase K 50 $\mu$ l (proK; TAKARA BIO inc., Otsu, Japan)と lysis buffer 450  $\mu$ l (100 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.5% Tween20)を加え、55 $^{\circ}$ Cで一晩振盪させた。その後、フェノール・クロロホルム抽出により、タンパク質や脂質などを取り除き、エタノール沈殿により DNA を精製した。次に PCR により目的の遺伝子を持っているのかを確認した。PCR に用いたプライマーは Tomita ら論文を参考にした (Tomita et al., 2009)。Forward primer; 5'-TCTGAGTGGCAAAGGACCTTAGG-3', Reverse primer; 5'-CGCTGAACTTGTGGCCGTTTACG-3'。PCR の反応には PCR kit (TaKaRa Taq Hot Start Version; TAKARA BIO inc., Otsu, Japan)を使用した。DNA 1  $\mu$ g, PCR buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l, forward primer 0.3  $\mu$ l, reverse primer 0.3  $\mu$ l, Taq 0.3  $\mu$ l を加え、95 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min で行い、サイクル数は 35 で行った。その後、PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動し、1000-1500 bp の位置にバンドがあれば目的の遺伝子を持った Tg ラットだと判断した。

### 1-2-2. 組織染色

ChR2 が発現しているラットにジエチルエーテルで深い麻酔をかけ、腹部・横隔膜を切開し、心臓の右心房を切開後、心臓の左心室からリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を灌流した。脱血後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)/0.1M リン酸緩衝液の固定液で灌流固定した。その後、脳を単離し、同様の固定液で脳を一晩固定した。4% PFA により固定された脳は 30% スクロース/PBS 液に移し、3 日間かけてスクロース置換を行った。その後 OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA)に包埋し、-80 $^{\circ}$ Cで凍結させた。その後、脳はクライオスタット(Micron, Walldorf, Germany)を用いて厚さ 40  $\mu$ m の axial 脳スライスにし、浮遊脳スライスとして以後の免疫染色実験に用いた。

脳スライスを tris-buffered saline (TBS)で 10 分間洗浄する間に DAPI

(4',6-diamidino-2-phenylindole ; 核染色に用いられる蛍光色素、Sigma、1/5000 希釈、5 分間振盪)で核染色を行った。その後、脳スライスをスライドガラスに乗せ、封入剤 (Shandon Immu-Mount; Thermo Scientific, Pittsburgh, PA)で封入した。脳スライスを共焦点レーザー顕微鏡(TCS SP2; Leica Microsystems, Tokyo, Japan)により観察し、Chr2-Venus の発現を確認した。

### 1-2-3. fMRI 撮像

Opto-fMRI を行うラットには前日にカニューレを装着する手術を行った。まずラットにジエチルエーテルで導入麻酔後、ケタミン(三共株式会社, Tokyo, Japan)を 100 mg/kg、キシラジン(バイエル薬品株式会社, Tokyo, Japan)を 25 mg/kg の濃度で筋肉注射により麻酔を導入した。十分な麻酔効果を確認した後、ラットを固定器 (Model 900, KOPF Instruments, Tujunga, CA)で固定した。頭皮を切開した後、ドリルを用いてカニューレを導入するための開口部を頭蓋骨に作製した。カニューレは MRI の磁場の影響を受けないように非磁性のガラス製のカニューレ (World Precision Instrument, Inc., Sarasota, USA)を使用した。カニューレは海馬の DG (ブレグマから体軸方向 (AP)に-3.3 mm/外側方向 (ML)に-1.5 mm/腹側方向 (DV)に-2.8 mm)に挿入した。その後、カニューレと頭蓋をデンタルセメント GC UNIFAST II (GC CORPORATION, Tokyo, Japan)で固定した。ラットが麻酔から回復するまで、37°Cに温めておき、その後、ホームケージに戻した。

カニューレ手術に用いた麻酔の効果が切れるまで十分に時間をおくため、翌日に MRI 撮像を行った。まず、ラットにジエチルエーテルで導入麻酔後、 $\alpha$ -chloralose (Sigma, 0.1M boric acid, 30 %プロピレングリコールの溶液に溶解)を 50 mg/kg の濃度で腹腔投与して長時間麻酔を行った。通常 MRI 撮像時の麻酔にはケタミンとキシラジンの混合液またはイソフルランを使用するが、これらの麻酔は神経系を抑制するため、神経活動を測定する fMRI には向かない。そこで不動麻酔として用いられる  $\alpha$ -chloralose を使用した (Tsurugizawa et al., 2010; Williams et al., 2010)。 $\alpha$ -chloralose は長時間麻酔が可能のため、fMRI を行う上で、一番適している麻酔の一つに考えられている。

麻酔が十分に効いた後、ラットを温水循環付の固定具に固定し、光ファイバーをカニューレの中に挿入した。MRI データの取得は全て Varian 製の 4.7 tesla 小動物用 MR 装置 (東京大学大学院新領域創成科学研究科先端エネルギー工学専攻大崎研究室)で東京大学大学院工学系研究科電気系工学専攻の関野正樹准教授の指導の下に実施した。MR 信号の送受信はサーフェース型コイルを用いた。サーフェース型コイルは脳全体の撮像には不向きだが、サーフェース型コイル付近のシグナルノイズ比 (signal-noise ratio, SNR)がとても高いという特徴がある。本研究では海馬に注目しているため、サーフェース型コイルを用いて海馬における SNR を高めた。

まず始めに脳の測定領域を確認するため、T1 強調画像(T1WI)を撮像した。T1WI はスピ

ンエコー二次元マルチスライス画像法を用いて、TR=500 ms, TE=15 ms, 9 axial slices, field of view=30 mm×30 mm, matrix=128×128, slice thickness=1.5 mm, slice gap=0 mm, voxel size=0.23 mm×0.23 mm×1.5 mm のパラメータで撮像した。次に解剖画像として T2 強調画像(T2WI)を撮像した。T2WI は T1WI 同様にスピンエコー二次元マルチスライス画像法を用いて、TR=3000 ms, TE=80 ms, 20 axial slices, field of view=30 mm×30 mm, matrix=128×128, slice thickness=1.5 mm, slice gap=0 mm, voxel size=0.23 mm×0.23 mm×1.5 mm のパラメータで撮像した。次に機能画像を撮像した。機能画像には FLASH (第 2 章 2-1-5 で詳しく述べる)を用いて、TR=156.2 ms, TE=15 ms, flip angle= 20, 6 axial slices, 80 volumes, field of view=30 mm×30 mm, matrix=128×128, slice thickness=1.5 mm, slice gap=0 mm, voxel size=0.23 mm×0.23 mm×1.5 mm, time resolution=20 s のパラメータで約 26 分間撮像した。

fMRI の撮像後、カニューレ挿入部を詳しく調べるために、高解像度の T1WI を撮像した。まずカニューレが挿入されているラットにジエチルエーテルで深い麻酔をかけ、腹部・横隔膜を切開し、心臓の右心耳を切開後、心臓の左心室から PBS を灌流した。脱血後、頭部を単離し、頭部を MRI 装置に入れた。MR 信号の送受信は 66 mm volume coil を用いた。66 mm volume coil はサーフェース型コイルより SNR は低くなるが、脳全体を均一に撮像する事が出来る。T1WI はスピンエコー二次元マルチスライス画像法を用いて、TR=500 ms, TE=15 ms, 9 axial slices, field of view=30 mm×30 mm, matrix=128×128, slice thickness=1.5 mm, slice gap=0mm, voxel size=0.23 mm×0.23 mm×1.5 mm, average=800 のパラメータで 12 時間 55 分間撮像した。さらに高解像度の解剖画像を得るために difussion weighted image (DWI)を撮像した。DWI の撮像パラメータは次の通りである。TR=3000 ms, TE=50 ms, 10 axial slices, field of view=30 mm×30 mm, matrix=128×128, slice thickness=1.5 mm, slice gap=0 mm, voxel size=0.23 mm×0.23 mm×1.5 mm, b-value=1496 s/mm<sup>2</sup>。撮像は 55 時間行った。

光刺激のための光源として 473 nm の青色レーザー (BL473T3-100FC; Shanghai Laser and optics century, Co., China)を用いた。刺激パターンを調節するため、光源にファンクションジェネレーター (ADR-700A; Shanghai Laser and optics century, Co., China)を接続した。また光媒体として直径 200 $\mu$ m の光ファイバー (AFS105/125Y; Thorlabs Japan, Inc., Japan)を用いた。刺激装置が MR 装置の磁場に影響しないように光ファイバーの長さを十分 (約 7 m)にとり、光刺激装置と MR 装置の間に距離を取った。光刺激は 10 mW (50 mW/mm<sup>2</sup>), 10 Hz, 10 ms width の頻度で 2 分間、計 6 回行い、刺激と刺激の間には 2 分間の安静時間を設けるという方法で行った。刺激開始の時間は fMRI 撮像開始の 2 分後とした (Fig. 3E)。

#### 1-2-4. Opto-fMRI 解析

fMRIデータの解析ソフトとしてMATLAB (2010b, Mathworks, Inc., Sherborn, MA)上で起動する Statistical Parametric Mapping (SPM5 ; Welcome Trust Center for Neuroimaging, England, UK)を使用した。SPMはヒト用の解析ソフトであるため、voxelサイズや画像処理のパラメータがヒトサイズになっている。そこで、SPMにおいてサイズに関するパラメータをヒトのサイズからラットのサイズに書き換えた。

まず始めにfMRIのデータをSPMに読み込ませるため、analyze format (拡張子がと.hdr)に変換しなければならない。本研究で使用したMR装置のデータ形式はFDR形式であるため、MRIcro (Center for Advanced Brain Image, Atlanta, USA)を用いてanalyze formatに変換した。次に前処理として、realignment、co-register、normalizeを行った。時間分解能が20秒と長く、Slice timingによるスライス間の時間補正は難しいため、行っていない。標準脳(template)はあらかじめ撮像しておいたラット20匹分のT2WIのデータを平均した画像を使用した。FWHM (full width at half maximum)を0.936×0.936×6 mmに設定して、smoothingを行った。

光刺激したプロトコルをデザインマトリクスにして、前処理を行ったデータと合わせて、統計処理を行った。統計処理はvoxel毎にt-testを行い、安静時に対して光刺激した時、有意に(uncorrected,  $p < 0.01$ )シグナルが増加しているvoxelを抽出し、tコントラストマップを作成した。この時、全脳マスクを用いて、脳領域のみに限定して、統計解析を行った。tコントラストマップをあらかじめ撮像しておいたT2WIに重ね合わせて表示し、どの領域が活動しているのか可視化した。さらにより解像度の高いdiffusion weighted image (DWI)を解剖画像としてtコントラストマップに重ね合わせた。今までの作業を全個体間で行い、個体ごとのtコントラストマップを作成した。最後にそれぞれのtコントラストマップを用いて、集団解析を行った。集団内で特異的に活動している領域を作成する個体間解析はone sample t-testにより統計処理を行った。そこで得られたtコントラストマップをDWIの解剖画像に重ねた。

経時的なBOLD信号の抽出はSPMのExtension toolboxにあるMarsBar (MRC Cognition and Brain Sciences Unit, Cambridge, UK)を用いて行った。ROIはDG(ブレグマから、-2.20 mm ML, -3.40 mm DV, -3.30 mm AP)と、CA3(ブレグマから、-3.17 mm ML, -3.40 mm DV, -3.30 mm AP)に直径0.5 mmの球状のROIを設定し、そのROI内のBOLD信号をMarsBarにより抽出した。そして、光刺激を行っていない時の全BOLD信号を平均した値を基準として、光刺激によりBOLD信号の上昇率を経時的に表した。

#### 1-2-5. 統計解析

本研究では、数値は全てMean±SEMで表示した。統計の種類と有意水準はそれぞれの結果に関連する図のレジェンドに記載した。



### 1-3. 結果

始めに、本研究で使用したトランスジェニックラットについて、ChR2 の発現を確認した。ChR2 は蛍光タンパク質である Venus との融合タンパク質として発現しているため、Venus の発現を調べる事で、ChR2 の発現を調べた。その結果、ChR2 は海馬全体に発現している事が分かった (Fig. 3A)。さらに、DG の顆粒細胞層における ChR2 の発現も観察した結果、DG の神経細胞に ChR2 が発現している事が観察出来た (Fig. 3B)。

本研究の目的である放射線照射による海馬ネットワーク変化の解析を、新生ニューロンに着目して解析するため、新生ニューロンが存在する海馬 DG のターゲットとして、Opto-fMRI 実験を行った。

DG に光刺激を行うため、ラットの右 DG にカニューレを挿入し、そのカニューレを通して光ファイバーを挿入した (Fig. 3C)。光刺激のタイミング等は Fig. 3E に示した。fMRI 撮像の前に T2 weighted image (T2WI) の撮像を行い、カニューレが右海馬 DG に適切に挿入されているのかを T2WI データにより確認した。さらに、カニューレが挿入されている位置を正確に知るため、カニューレが挿入されているラットの脳を単離し、T1 weighted image (T1WI) の撮像を行った (Fig. 3D)。カニューレが正しく挿入されていない個体は解析から除外した。次に、正確にカニューレが挿入されている個体の fMRI データを解析した。

DG を光刺激した時、その光刺激によって誘導された神経活動を解析した。統計解析により、光刺激していない時に比べ、光刺激している時に、BOLD 信号が有意に増加している領域を、光刺激により神経活動が誘導された領域とした。解析結果について、3 個体の結果を Fig. 4 に示した。統計解析の結果、DG の光刺激により、BOLD 信号が増加した領域を得る事が出来た (Fig. 4A, D, G)。それぞれの個体において、DG と CA3 領域において、BOLD 信号の経時的な増加率を求めた (Fig. B, C, E, F, H, I)。その結果、光刺激により、BOLD 信号が増加している事が分かった。これにより、光刺激により DG で誘導された神経活動は CA3 に伝達される事を確認する事が出来た。また、Fig. 4G の個体に関して、反対側の DG においても神経活動の増加を観察する事が出来た。さらに、Fig. 4 で解析した 3 個体分の反応をまとめた結果、DG への光刺激によって、DG と CA3 領域において、光刺激に伴う BOLD 信号の増加を確認できた (Fig. 5)。

これらの結果より、DG への光刺激により、DG と CA3 領域の神経活動を誘導できる事が分かった。さらに、海馬における Opto-fMRI 実験が可能である事が示された。

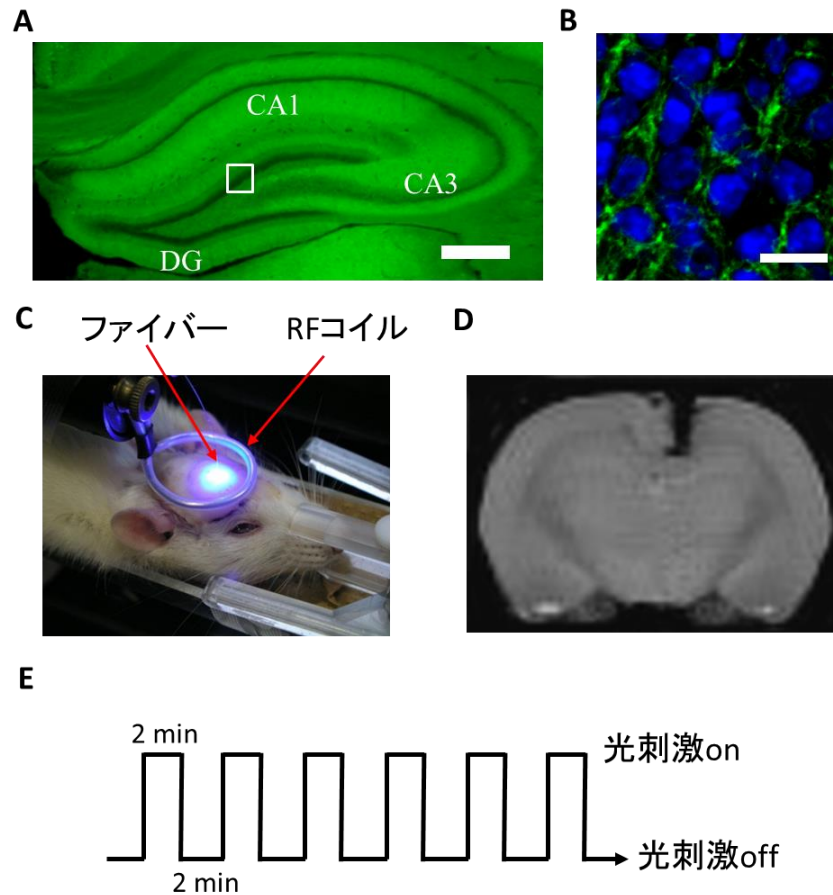


Fig. 3 ChR2 ラットと Opto-fMRI

(A) 海馬における ChR2-Venus (緑)の発現領域を示す。海馬全体に発現している事が確認できた。scal bar=1 mm。(B) DG の顆粒細胞層 (Fig. 3A の白四角領域)における ChR2 の発現領域を示す。青: DAPI (核)。scal bar=10  $\mu$ m。(C) Opto-fMRI におけるラットへの光刺激の様子を示す。(D) ラット DG に光ファイバーを挿入するためのカニューレを挿入した位置の確認。T1WI の代表例を示す。海馬 DG にカニューレが挿入されている事が確認できる。(E) 光刺激のプロトコルを示す。光刺激の on/off を 2 分毎に 6 回繰り返した。

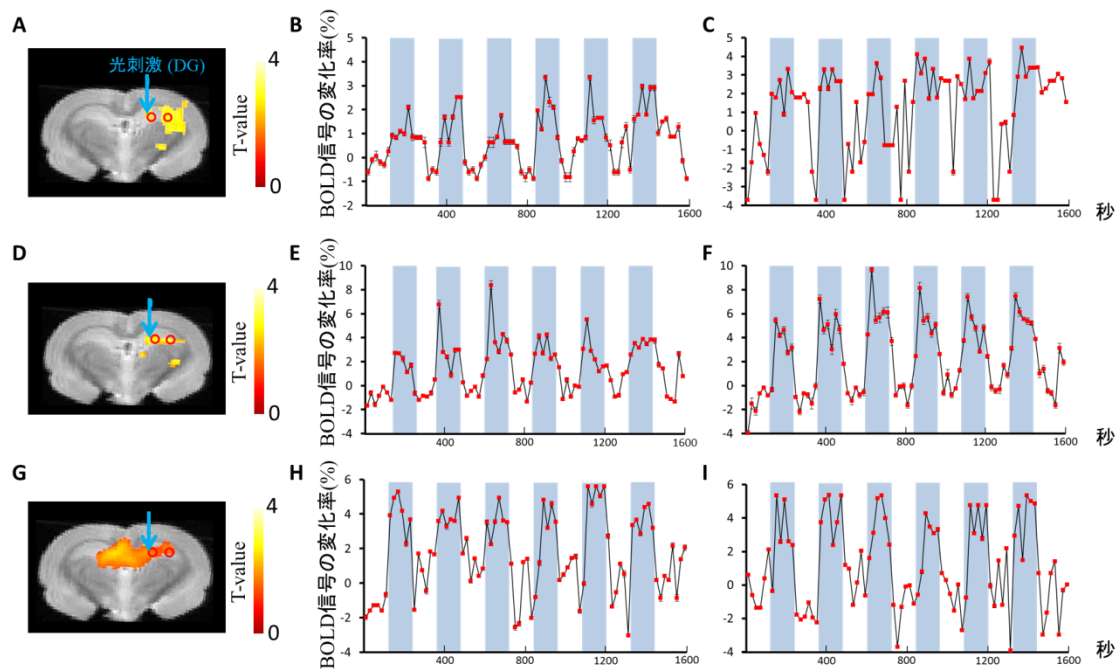


Fig. 4 個体毎における DG を光刺激した時の海馬神経活動

海馬 DG (矢印)を光刺激した時に得られた Opto-fMRI の個体解析の結果について 3 例を示す (A, D, G)。有意水準は uncorrected  $p < 0.01$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。ラット脳はブレグマから -3.3 mm の距離にあるスライスを示した。DG (B, E, H) と CA3 (C, F, I)における光刺激による BOLD 信号の変化率を示す。光刺激をしていない時の全 BOLD 信号の平均値を基準とし、BOLD 信号の経時的な変化率を求めた。青い領域は光刺激をしている時間を示す。A、D、G の赤円領域は BOLD 信号の変化率を求めた領域を示す。B、C は A の個体の変化率を、E、F は D の個体の変化率を、H、I は G の個体の変化率を示す。

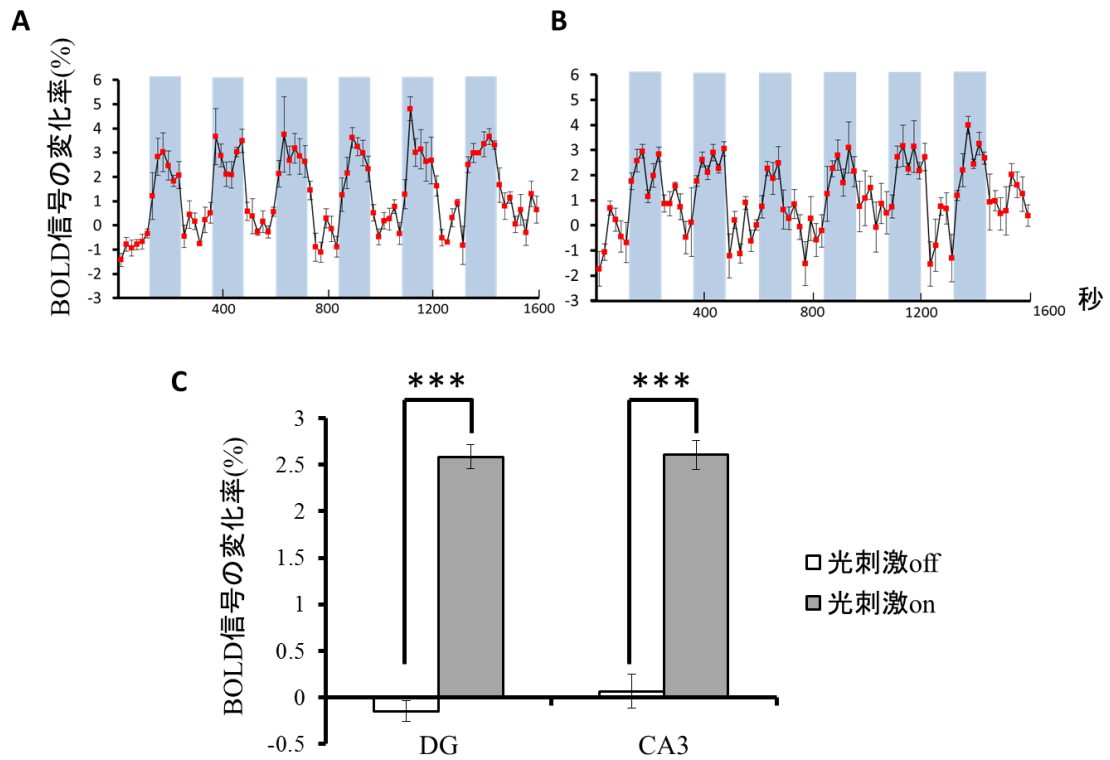


Fig. 5 DG を光刺激した時の海馬神経活動 (3 個体の平均)

DG (A)、CA3 (B)において、DG を光刺激した時の BOLD 信号の経時的な変化率について Fig. 4 で示した 3 個体の平均を示す。青い領域は光刺激をしている時間を示す。(C) DG を光刺激している時の BOLD 信号の変化率と、光刺激をしていない時の BOLD の変化率を比較した。光刺激により、BOLD 信号が上昇した事が確認できた。\*\*\*  $p < 0.001$  (student's t test)

#### 1-4. 考察

第1章ではまずラット海馬における Opto-fMRI の撮像技術の確立を目指した。磁場環境内で海馬を刺激するため、海馬にカニューレと光ファイバーを挿入し、T2WI 及び T1WI の撮像を行いカニューレと光ファイバーの挿入位置を確認し、正確に DG を刺激しているのかを判断した。Opto-fMRI のデータを取得し、得られたデータを SPM により解析を行った。個体ごとに得られたデータを見ると、光刺激を行った DG の反応や DG と繋がっている CA3 領域の反応を得る事が出来た。これは DG からの信号が DG に存在しているニューロン (成熟ニューロンと新生ニューロン) の軸索 (苔状線維) を伝わって CA3 錐体細胞へ伝えられたためだと考えられる。また CA3 錐体細胞は連合線維と呼ばれている軸索を他の CA3 錐体細胞へ伸ばしており、CA3 の信号を強めたと考えられる。さらに DG の上方向にある CA1 領域においても微弱な反応が見られた。これは CA3 から CA1 への投射によるものであると考えられる。また、DG を光刺激した時、反対側の DG においても、神経活動が見られた個体もあった。これは DG の hilus 領域に存在している苔状細胞 (mossy cell) が関係している事が考えられる。苔状細胞の軸索は反対側の DG に投射している事が分かっている (Amaral et al., 1978)。また、3 個体における結果において、神経活動が誘導された領域には違いが生じている。これは、個体差が原因ではないかと考えられる。この実験において、光ファイバーの挿入位置に関して、 $\mu\text{m}$  単位による位置調整は行っていない。そのため、光ファイバーの挿入位置の違いにより、誘導された神経活動の領域が異なっただけではないかと考えられる。以上より、ラット海馬において Opto-fMRI 解析が可能であると判断した。

高磁場における小動物用 MRI 装置の開発により、小動物における脳の細部まで非侵襲的なイメージングが可能となった。本研究でも、4.7 tesla の小動物用 MRI 装置による fMRI を用いて海馬の機能的なイメージングを行った。MRI を用いた海馬の研究はヒトやラットを対象とした論文は多くはない。ヒトを対象とした MRI 研究では、一般的に 1.5 tesla または 3 tesla の低磁場の MRI 装置が多く、海馬の細部までイメージングする事は難しい。特に DG や CA3 領域のように海馬の領域を詳細に解析する事は難しい。それに対して、ラットやマウスを用いた MRI 研究は高磁場の MRI 装置を用いる事が出来るため、海馬領域の詳細な解析が可能となる。

ラットを用いた海馬の fMRI 研究は何報か報告はあるが、どの論文も金属電極を用いて海馬を刺激し、その反応を fMRI により解析するという手法を用いている (Canals et al., 2008; Angenstein et al., 2007, 2009)。しかし、金属電極を用いて刺激を行っているため、高磁場環境で行う MRI では BOLD 信号が阻害されている可能性が考えられる。そのため、本研究では Optogenetics を用いて光ファイバーによる光刺激を行う事で BOLD 信号の阻害の可能性を無くした。

fMRI の解析には一般的に使用されている SPM を用いた。SPM の他に、fMRI 解析用の

プログラムとして FSL、AFNI、Brain Voyager など有名なプログラムソフトが存在している。SPM はその中でも前処理における正確性や統計学的な処理の応用性に富んでいることから、一番優れた fMRI 解析ソフトであると考えられている。しかし、SPM はヒト用の解析ソフトであるため、小動物で応用するためには高度な解析技術が必要であった。そこで、本研究では、SPM プログラムのプラットフォームを小動物でも行えるように書き換える事によって、ラットでも fMRI の解析を可能にした。特に前処理の **normalize** の作業においては、fMRI データを標準脳に合わせる事が難しく、**normalize** のパラメータや画像解像度が違えば正しく **normalize** をする事は出来ない。多くの論文でもラットやマウスの標準脳を紹介しているが、MRI 装置が違えば、パラメータや画像解像度、データの種類が異なり、**normalize** が難しくなる。そのため本研究では標準脳のデータを作る事から始めた。標準脳は 20 個体分のラット解剖画像 (T2WI) を撮像し、得られたデータを SPM で標準化する事で得た。この標準脳を用いて fMRI データの **normalize** に成功した。標準脳への **normalize** が可能になった事から、統計学的集団解析を行えるようになり、神経活動の変化やネットワークの変化について評価する事が可能となった。この SPM を用いた **voxel-based analysis** の解析手法によって、第四章で行う **VBM (voxel-based morphometry)** 解析や **DTI (diffusion tensor imaging)** 解析に応用する事が可能となった。

第一章では、頭部への放射線照射による海馬ネットワーク変化を解析するための技術として、ラット海馬における **Opto-fMRI** 技術の確立を行い、ラット海馬における **Opto-fMRI** 解析が可能である事が示された。そこで、第二章では、この手法を用いて、放射線照射による海馬ネットワーク変化の解析を行った。

## 第二章

### ラットを用いた放射線照射による認知機能障害と 海馬ネットワーク変化の解析

## 2-1. 序論

第二章では、放射線照射により新生ニューロンに障害が生じた時に、海馬ネットワークが変化するのかを調べる事を目的とした。そこで、新生ニューロンの増殖に対して十分に障害を起こさせる放射線線量（ガンマ線 10 Gy）をラットの頭部に照射し、海馬神経活動の変化と海馬ネットワーク変化を解析した。海馬神経活動の解析には、第一章で行った Opto-fMRI を用いた。海馬ネットワーク解析には、rsfMRI を用いた。

### 2-1-1. 新生ニューロンと認知機能

昔から成体において神経細胞は新しく生まれないと考えられていたが、1965年に成体げっ歯類の海馬において神経細胞は分裂を繰り返し、新しい神経細胞が絶えず生まれているという発見があった(Altaman et al., 1965)。この研究により神経新生 (neurogenesis)の研究が盛んになり、多くの事が分かってきた。成体神経新生では側脳室下帯(subventricular zone; SVZ)、海馬歯状回 (dentate gyrus, DG)の顆粒細胞下層(subgranular zone; SGZ)の2つの領域で起きている事が分かっており、ここに神経幹細胞が存在する事も分かっている。神経幹細胞は神経前駆細胞を経て未成熟神経細胞、成熟神経細胞へと分化していく。本研究では、この若い成熟神経細胞を新生ニューロンと呼んでいる (Fig. 6B)。新生ニューロンの細胞体は DG に存在しており、その軸索は海馬 CA3 領域に伸びている。海馬 DG の神経細胞 (新生ニューロンと成熟ニューロン)は嗅内皮質から伸びている貫通繊維より入力を受け、CA3 領域に出力している (Fig. 6A)。また DG は中隔野からの入力も受けている事が分かっている。海馬からの出力は主に CA1 から海馬采や脳弓を通して、前頭葉や他の領域に出力される。

げっ歯類を用いた研究から、新生ニューロンは海馬依存的な認知記憶、特に空間認知記憶に関与している事が分かっており、神経新生を促進すると空間認知記憶能力が高まり、逆に神経新生を抑制すると空間認知記憶能力は低下するという報告もある (Kitamura et al., 2009; Amador et al., 2011; Sahay et al., 2011)。また、新生ニューロンは認知機能に関与している事から、記憶形成を担っている海馬ネットワークにも大きく関与しているのではないかと考えられている。また、新生ニューロンは海馬成熟ニューロンとは違う独特の性質を持っている事から、海馬ネットワークにおいて何らかの機能を持っている事が推測される。新生ニューロンは成熟ニューロンと比べ、発火の閾値が低く (Doetsch et al., 2005; Ge et al., 2008; Mongiant et al., 2009)、また発火のパターンが違うという事が分かっている (Toni et al., 2008; Lacefield et al., 2012)。また、認知機能に大きく関与している長期増強 (long-term potentiation, LTP)が起こる閾値も低い事が知られている (Schmldt-Hleber et al., 2004)。これらの事から、新生ニューロンは成熟ニューロンと比べ、発火しやすいが、発火の大きさは小さい事が示唆される。これにより、新生ニューロンは海馬ネットワーク



において、成熟ニューロンとは違う何らかの役割を担っている事が示唆される。しかし、新生ニューロンが海馬ネットワークにおいてどの様な役割を担っているのかは分かっていない。

新生ニューロンは神経幹細胞からの発生段階初期（神経幹細胞から分裂後、1週間以内）において、DGに近いCA3領域の神経細胞とシナプスを形成し始めるという報告がある事から (Ide et al., 2008)、新生ニューロンは発生の早い段階で海馬ネットワークに組み込まれ始めると考えられる。しかし、この段階の新生ニューロンは神経機能を有しておらず、海馬ネットワークにおける役割は低いのではないかと考えられる。新生ニューロンが海馬ネットワークに機能的に組み込まれるのは、神経幹細胞から分裂後4-6週間後ではないかと考えられている (Zhao et al., 2006; Ge et al., 2007; Toni et al., 2008; Denny et al., 2012)。これは、分裂細胞に感染するレトロウイルスを用いて新生ニューロン特異的にGFP標識を行い、軸索形成やシナプス形成を観察した結果から推察されている。また神経幹細胞の分裂を阻害した後、4-6週間後のみにおいて認知機能障害が表れ、5ヶ月後では障害が見られなかった事からも推測される (Denny et al., 2012)。本研究においても、海馬ネットワークに機能的に組み込まれるとされている神経幹細胞から分裂後6週間経過した新生ニューロンに着目している。

この新生ニューロンの研究を行うために、多くの研究者は新生ニューロンの機能を阻害させた状態、または活性化させた状態の時に、新生ニューロンの機能を評価してきた。この新生ニューロンの機能を阻害させる簡便な方法として、従来から放射線照射を用いてきた。分裂を行っている神経幹細胞や神経前駆細胞は放射線に対する感受性が高く、放射線照射により、影響を受けやすい (Tada et al., 2000; Monje et al., 2002)。一般的に、放射線はDNAにダメージを与え、これに伴ってアポトーシスを誘導し、細胞死に至る。このため、分裂細胞である神経幹細胞や神経前駆細胞は放射線照射により、アポトーシスが誘導される (Peissner et al., 1999; Tada et al., 2000)。そのため放射線照射により、新生ニューロン数を低下させ、その機能を評価する事ができる。

## 2-1-2. 放射線照射と認知機能

頭部への放射線照射により、認知機能障害が起こる事が知られている (Taphoorn et al., 2004; Li et al., 2008; Raber 2011; Greene-Schloesser et al., 2012)。認知機能に関与している脳領域に放射線が照射されると、その領域の神経細胞に障害が起こる事により、認知機能に影響が見られる。特に認知機能に大きく関与している海馬に放射線が当たると認知機能障害が顕著に見られる。中高齢者の脳腫瘍患者では放射線治療後、認知症が起こる事がある (DeAngelis et al., 1989)。また小児がんの患者が放射線治療を受けると、脳の発達期に当たる事から、知能発達に影響が出る事もある (Mabbott et al., 2011; Conklin et al., 2012)。

この放射線照射による認知機能障害の原因として、新生ニューロンの減少が挙げられる (Rola et al., 2004; Saxe et al., 2006; Deng et al., 2009; Kitamura et al., 2009)。放射線照射によって、認知機能に関与している新生ニューロンに影響が生じ、認知機能に障害が起こるのではないかと考えられている。他の原因として、ネクローシスや白質損傷も挙げられるが、放射線治療の改善により、ネクローシスや白質損傷を出来るだけ防ぐ事も可能となってきた。本研究では、放射線照射による認知機能障害の原因の一つである新生ニューロンの影響を考慮して研究を行った。

放射線照射により認知機能障害が見られる時、新生ニューロン数の減少により、海馬神経活動と海馬ネットワークに何らかの影響が出ていると推測される。特に新生ニューロンが存在する海馬 DG とその投射先である CA3 領域に影響が出るのではないかと考えられる。そこで、この章では放射線を照射した時、海馬神経活動と海馬ネットワークが変化するかを調べる事を目的とした。新生ニューロンの影響を観察するため、新生ニューロン数を十分に減少させる線量 (10 Gy) を照射し、実験を行った。海馬神経活動の解析には、第一章で行った Opto-fMRI を用いた。海馬ネットワーク解析には、resting state fMRI (rsfMRI) を用いた。

### 2-1-3. rsfMRI

rsfMRI は none-tasked fMRI に分類され、安静時における BOLD 信号を計測する手法である。tasked fMRI とは違い、神経活動の誘導は行わず、安静時の神経活動を計測する。一般的に安静時において、神経活動は不活性化しているのではないかと考えられていたが、rsfMRI により、安静時に活動するネットワークが発見された (Biswal et al., 1995)。安静時における神経活動では BOLD 信号は 0.01-0.08 Hz の周期で揺らいでいる事が知られている (Biswal et al., 1995)。この事を low-frequency fluctuation (LFF) と呼んでいる。

rsfMRI では、異なる領域での BOLD 信号の LFF の同調率から、各領域間の接続の強さ(functional connectivity, FC)を解析する事が出来る。この解析方法を functional connectivity (FC)解析という (Cao et al., 2012)。FC 解析は ROI-based FC 解析とも呼ばれている。関心領域 (region of interest, ROI)を独自に設定し、この ROI に対する機能的な接続の強さを算出する。ROI 領域における BOLD 信号の LFF を平均した値を基準の LFF (ROI の LFF とする)とする。そして ROI の LFF に対し、各 voxel (3D の画素を voxel と呼ぶ)の LFF と相関を取る事で ROI と各 voxel の FC を算出する。FC 解析に関する簡単な模式図を Fig. 7 に示した。FC 値は ROI と各 voxel の LFF 値から求めた相関計数 (R)を Fisher's Z-score 変換した Z-score を指標として用いる。Z-score 値が高ければ高い程、ROI とその voxel の接続が高い事を示す。また Z-score が正の値であれば、ROI とその voxel の接続が正の相関がある事を示す。つまり、ROI とその voxel が接続を持っている事を示す。逆に負の値であれば、ROI とその voxel の接続

が負の相関である事を示す。コネクションが負の相関を示す事は、神経科学的に何を表しているのかまだ分かっていない。機能的に分離されていると考えられているが (Gee et al., 2011)、定かではない。

rsfMRI は主にヒトの研究に用いられてきた。特にアルツハイマー病 (Hahn et al., 2013; Balachander et al., 2014)や加齢研究 (Andrews-Hanna et al., 2007)に用いられてきた。これらの研究において、Resting state network の一つである default mode network (DMN)が着目されている。DMN は安静時においても認知機能に関与しているネットワークである事が分かっており (Andrews-Hanna et al., 2007)、アルツハイマー病や加齢により DMN が減少する事が分かっている (Andrews-Hanna et al., 2007; Hahn et al., 2013; Balachander et al., 2014)。この DMN の研究により、ヒトを用いた rsfMRI 研究が脚光を浴びている。

近年では MRI 装置の発展と fMRI 技術の発展により、マウスやラットの小動物を用いた fMRI 研究が可能となってきた。これにより、遺伝子改変動物や様々な病態モデル動物を用いて rsfMRI 研究によるコネクション解析が行われている。

#### 2-1-4. rsfMRI 解析

rsfMRI 解析の全体的な流れを Fig. 8 に示した。大まかな解析の概要を以下に示す。前処理を行った後、FC 解析を個体毎に行う。そして、集団的統計解析を行い、個体間で共通してコネクションがある領域を統計学的に算出する。

前処理については第一章の 1-1-4 の項目で述べた。前処理の次に LFF の処理を行う。rsfMRI 信号 (BOLD 信号)は撮像中に一定の線形の傾向をもって上昇または下降する事が多い。rsfMRI データの長時間撮像により、傾斜磁場コイル等発熱による温度変化で各コイルの抵抗値が変化し、rsfMRI 信号が変化してしまうためである。このため線形傾向の信号変化を補正する必要がある。この処理を Trend Filter と呼ぶ。次に、安静時における BOLD 信号は 0.01-0.08 Hz のゆらぎを持っている事から、high pass filter と low pass filter を用いて、0.01-0.08 Hz 以外の信号は除外する。この周波数帯域から外れる領域の周波数は主に体動の変化や撮像時のノイズと考えられている。

次にこのフィルター処理を行ったデータを用いて、FC 解析を行う (この作業は 2-1-3 の項目を参照)。ここまでの解析は個体毎に行う。全個体で同様な処理を行った後、集団解析を行い、個体間で共通してコネクションがある領域を抽出する。統計値 (t 値)を用いた t コントラストマップを作成し、この t コントラストマップを予め撮像しておいた解剖画像の上に重ね合わせる事で、どの領域に共通してコネクションがあるのかを判断する。

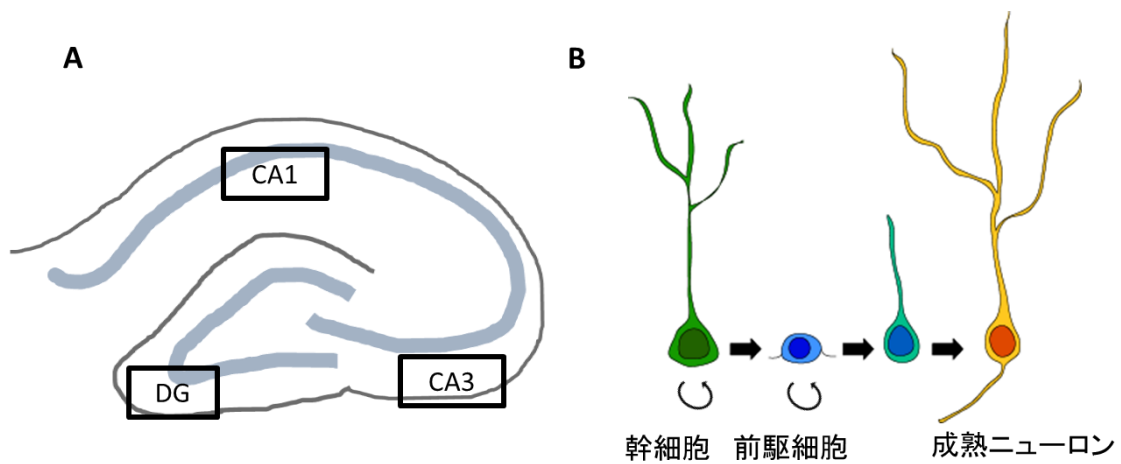


Fig. 6 海馬と神経新生

(A) げっ歯類における海馬の模式図を示す。海馬は DG、CA3、CA1 の 3 つの領域に分かれている。DG → CA3 → CA1 と信号は伝達される。海馬への入力は主に臭内皮質から DG へ入力される。海馬からの出力は主に CA1 から海馬采や脳弓を通して、前頭葉や他の領域に出力される。(B) DG には神経幹細胞が存在しており、その幹細胞から、分裂をしながら、前駆細胞を経て成熟ニューロンと分化する。この過程のことを神経新生 (neurogenesis) という。また、若い成熟ニューロンを新生ニューロンという。

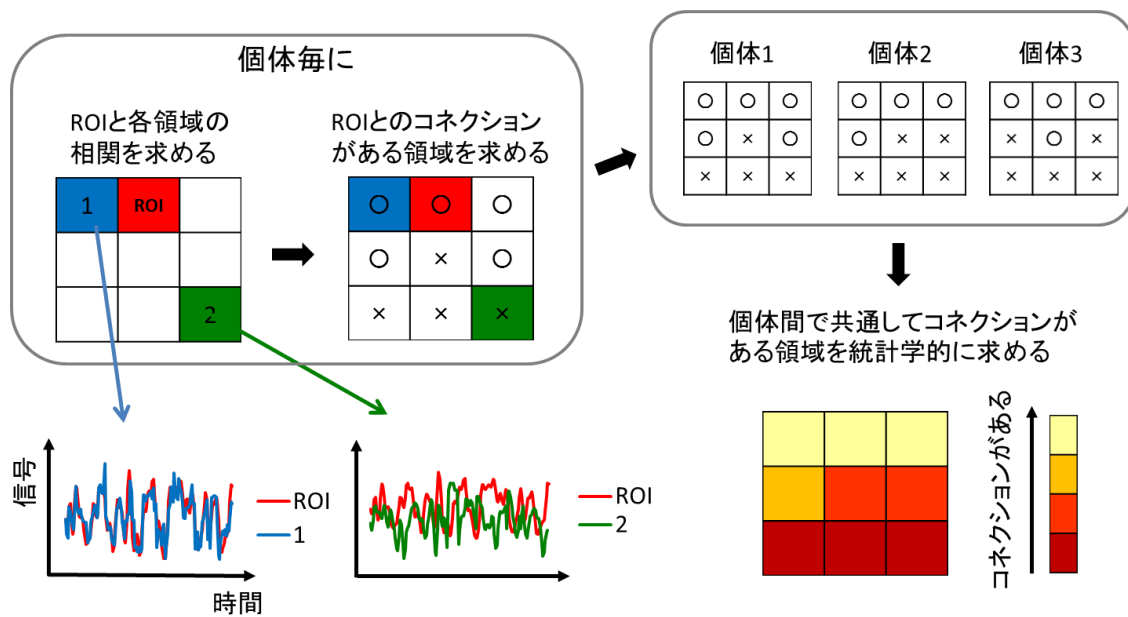


Fig. 7 FC 解析について

関心領域 (ROI)を独自に設定する。その ROI における BOLD 信号と 1 番の領域における BOLD 信号は相関が高い事から、ROI と 1 番の領域にはコネクションがあると言える。しかし、ROI と 2 番の領域では BOLD 信号の相関が小さい事から、コネクションはないと言える。この解析を個体毎に行い、個体間で共通してコネクションがある領域を統計解析から求める。統計値 (t 値)が高い程、コネクションが高い領域である事を示し、それをカラーバーによって表示させた。

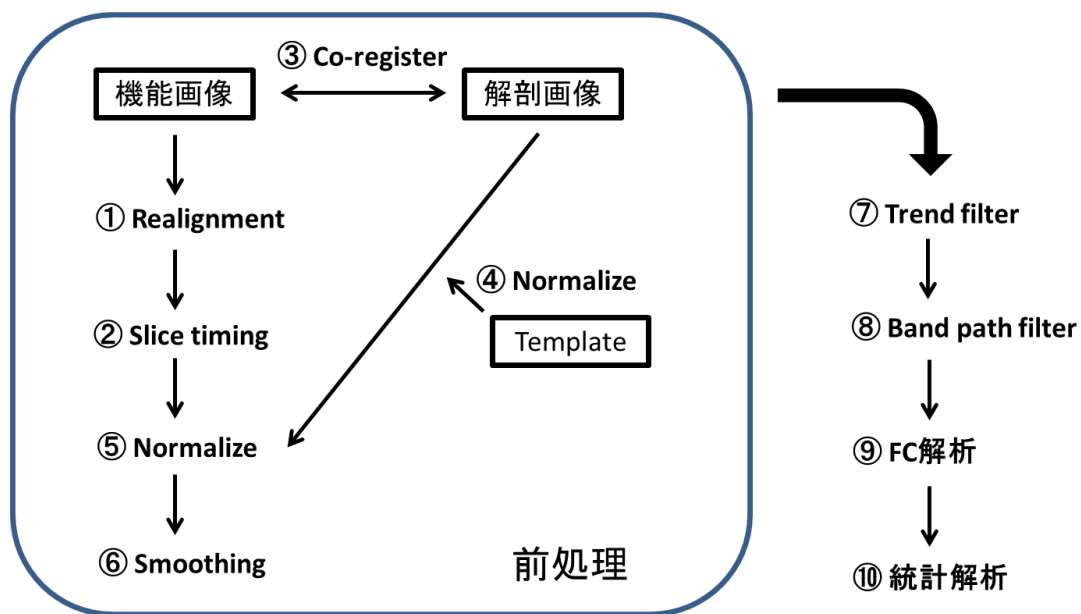


Fig. 8 rsfMRI 解析の流れ

機能画像 (rsfMRI 画像)を用いて **realignment** を行い、動体補正を行う。次に **slice timing** により、スライス間の時間補正を行う。次に機能画像と解剖画像で **co-register** を行い、位置情報の擦り合せを行う。解剖画像と標準脳 (template)を **normalize** し、この時の補正パラメータを用いて機能画像を **template** に **normalize** する。そして **smoothing** を行い、ノイズを除去する。ここまでを前処理という。前処理を行ったデータを用いて、線形傾向しある信号変化を補正する **trend filter** 処理を行い、0.01-0.08 Hz 以外の BOLD 信号を除去する **band path filter** 処理を行う。その後、FC 解析によりコネクション解析を行い、統計解析により、評価する。

## 2-2. 方法

### 2-2-1. 動物

第一章で用いたラットと同様なラットを用いた（第一章 1-2-1 を参照）。

### 2-2-2. 放射線照射

6 週齢のラットに 100 mg/kg ケタミン(三共株式会社, Tokyo, Japan)と 25 mg/kg キシラジン(バイエル薬品株式会社, Tokyo, Japan)を混合した麻酔液で筋肉注射により麻酔を導入した。麻酔が効いた後、ラットの胴体部を鉛の筒(1 mm の厚さの鉛板を筒状に 17 回巻き付けた)で保護し (Fig. 9)、頭部のみを露出させ、ガンマ線照射機(Elan 3000 ; MDS Nordion, Ottawa, Canada)に入れた。<sup>137</sup>Cs を線源とするガンマ線を 10 Gy/min の線量で 1 分間照射し、総量 10 Gy 照射した。その後、ラットは麻酔から回復するまで、37°Cに温めておき、ホームケージに戻して、1 週間後、6 週間後、4 ヶ月後に実験を行った。コントロール群は麻酔のみを行い、ガンマ線照射群と同様に 37°Cに温めておき、ホームケージに戻し、1 週間後、6 週間後、4 ヶ月後に実験を行った。

### 2-2-3. 行動実験

Contextual fear conditioning test は認知記憶(特に空間認知記憶)を評価するための記憶テストである。この実験を行うにあたって、動物を実験者に慣れさせ、実験中の環境音にも注意を払った。まず始めに、動物が実験者に慣れさせるため、実験を行う 1 週間前からハンドリングを行う。一日 5 分間ラットを手の上に乗せ、自由にさせておく。これを 1 週間行った。ハンドリングを行う時刻は、実験を行う時刻に合わせて行った。装置は MED-VFC-NIR-RS (Med associate, Inc., Albans, UK)を使用した。次に 1 日目として Conditioning を行った。ラットをある空間の中に 6 分間入れ、その 3,4,5 分後に電気ショック(1.0 mA, 2 秒間)をラットに行い、ラットにその空間と電気ショックによる恐怖を記憶させた。この 24 時間後に Contextual test を行った。ラットを Conditioning と同じ空間に 8 分間入れ、その時の freezing time を測定した。測定中の映像をビデオカメラにより録画し、その映像を元に MED-VFC-NIR-RS に付属している Video Freeze Software (Med associate, Inc., St. Albans, UK)のプログラムが自動的に freezing time を算出する。この時、freezing time の設定は Motion Threshold=35, Liner Min Freeze Duration=0.466 sec に設定した。freezing time の解析は Contextual test では 8 分間に対する freezing time と 8 分間を 4 分割した 0-2, 2-4, 4-6, 6-8 分に対する freezing time を測定した。空間は white light, flat roof, wipe with 70% isopropanol の条件に設定した。

#### 2-2-4. 免疫染色

新生ニューロン数を評価するため、免疫染色を行った。チミジンのホモログである BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine; Wako)は DNA 合成期に細胞に取り込まれるため、分裂細胞のマーカーとして用いられる。BrdU をラットに 100 mg/kg (生理食塩水に溶解)の濃度で腹腔投与した。投与期間は次の通りである。行動実験を行う 6 週間前に 2 日おきに計 3 回投与した。行動実験後、灌流固定を行った。

免疫染色に用いたラットは行動実験を行った後のラットを用いた。各群において、行動実験を行ったラットの内、5 匹のラットを用いて免疫染色を行った。ラットにジエチルエーテルで深い麻酔をかけ、腹部・横隔膜を切開し、心臓の右心房を切開後、心臓の左心室からリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を灌流した。脱血後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)/0.1M リン酸緩衝液の固定液で灌流固定した。その後、脳を単離し、同様の固定液で脳を一晩固定した。4% PFA により固定された脳は 30%スクロース/PBS 液に移し、3 日間かけてスクロース置換を行った。その後 OCT compound (Sakura Finetech, Torrance, CA)に包埋し、-80°Cで凍結させた。凍結させた脳はクライオスタット(Micron, Walldorf, Germany)を用いて厚さ 40 $\mu$ m の axial 脳スライスにし、浮遊脳スライスとして以後の免疫染色実験に用いた。この時、脳スライスは海馬全体を 48 スライスとした時、均等に 3 スライスを選び出し、BrdU 染色を行った。

脳スライスを TBS で 10 分間洗浄した。次に 10 mM クエン酸緩衝液(1.8 mM クエン酸, 8.2mM クエン酸ナトリウム)中にて 5 分間 90°Cで処理し、その後 30 分間室温にて静置させた。TBS で 10 分間洗浄した後、1M HCl にて 30 分間 37°Cで反応させ、さらに 0.1M ホウ酸緩衝液(50 mM boric acid, 12.5 mM borax)で 10 分間処理した。その後、1 時間ブロッキング液に反応させ、それぞれの一次抗体を加えた。ここで使用した一次抗体は anti-BrdU rat IgG (Oxford Biotech, 1/200 希釈、振盪時間は 1 日間)、anti-NeuN mouse IgG (Millipore, 1/1000 希釈、振盪時間は 1 日間)である。次に TBS で 15 分間、計 3 回洗浄し、それぞれの二次抗体を加え、室温で 2 時間振盪した。ここで使用した二次抗体は donkey anti-rat rhodamine (Chemicon, 1/250 希釈)、donkey anti-mouse Cy5 (Jackson Immunoreserch, 1/200 希釈)である。その後、TBS で 15 分間、計 3 回洗浄した。洗浄中に DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole ; 核染色に用いられる蛍光色素、Sigma, 1/5000 希釈、5 分間振盪)で核染色を行った。その後、脳スライスをスライドガラスに乗せ、封入剤 (Shandon Immu-Mount; Thermo Scientific, Pittsburgh, PA)で封入した。

染色が終わった 3 スライスを共焦点レーザー顕微鏡(TCS SP2; Leica Microsystems, Tokyo, Japan)で観察し、BrdU<sup>+</sup>/NenU<sup>+</sup>陽性細胞数をカウントした。この時、それぞれの陽性細胞は海馬顆粒細胞層に存在している細胞のみをカウントした。3 スライス分のそれぞれの陽性細胞数をカウントし、その合計数の 16 倍の数を一個体分の陽性細胞数とした。



### 2-2-5. fMRI 撮像

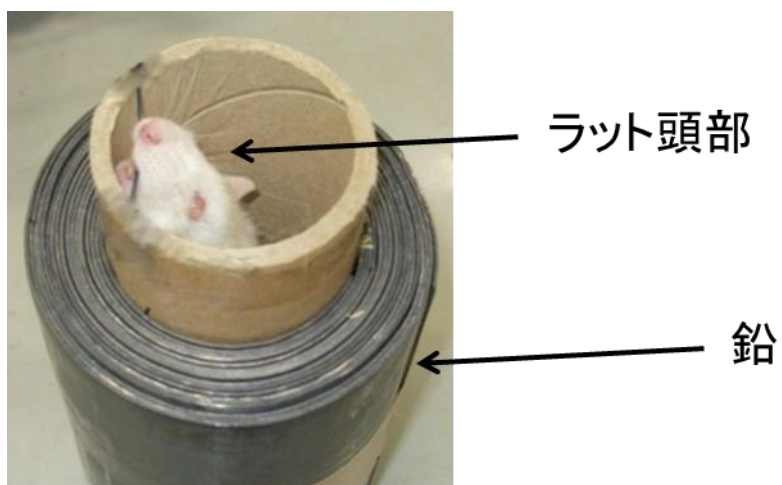
カニューレ手術、fMRI 撮像方法、光刺激は第一章と同様に行った（第一章 1-2-3 を参照）。fMRI 撮像に用いたラットは行動実験と免疫染色を行ったラットとは別のラットを用いて実験を行った。fMRI に関しては、Opto-fMRI と rsfMRI の 2 種類の fMRI を行った。撮像法はどちらも同様であるが、Opto-fMRI は光刺激を行い、rsfMRI は刺激を行っていない。始めに rsfMRI 用のデータを取得し、その後、光刺激を行った Opto-fMRI 用のデータを取得した。Opto-fMRI におけるコントロール群の一部のデータに関して、第一章で用いたデータと同様のデータを用いた。

### 2-2-6. Opto-fMRI 解析

第一章と同様に行った（第一章 1-2-4 を参照）。

### 2-2-7. rsfMRI 解析

前処理までは第一章の 1-2-4 の項目と同様に行った。次に SPM の Extension toolbox にある REST (<http://www.restfmri.net>) プログラムを用いて rsfMRI 解析を行った。rsfMRI における神経活動は 0.01-0.08 Hz の周波数にある LFF により表せるため、BOLD 信号が 0.01-0.08 Hz の領域以外にある BOLD 信号を除外した。次に region of interest (ROI) を置いた領域の LFF と他の領域の LFF との同調率をマップ化し、ROI 領域との functional connectivity (FC) を見る事が出来る FC 解析を行った。ROI は左海馬 DG の中心に直径 0.5 mm の球状の ROI を置いた。右海馬には Opto-fMRI を行うためにカニューレと光ファイバーが挿入されているため、右海馬に ROI を置く事は避けた。個体ごとに FC 解析を行った後に、SPM5 を用いて集団解析として one-sample t-test を行い、t コントラストマップを作成して、T2WI または DWI (diffusion weighted image) に重ね合わせて表示させた。コネクションの強さ (FC 値) は SPM の Extension toolbox にある MarsBar (MRC Cognition and Brain Sciences Unit, Cambridge, UK) を用いて解析した。海馬 CA3 に直径 0.5 mm の球状の ROI を作製した。DG に ROI を置き、FC 解析を行ったデータから CA3 の FC の値 (Z-score) を MarsBar により抽出した。この FC 値を全個体から抽出し、各群の平均値をその群のコネクションの強さとした。



**Fig. 9** ラット頭部への放射線照射

1 mm の厚さの鉛板を筒状に 17 回巻き付けた鉛を用いて、ラットの胴体部を保護し、頭部  
のみに放射線を照射した。

## 2-3. 結果

始めに、放射線照射による影響がどの段階で見られるのかを調べた。6週齢のラットの頭部にガンマ線 10 Gy を照射し、その1週間後、6週間後、4か月後に認知機能への影響と新生ニューロン数の変化を評価した(Fig. 10A)。認知機能の評価は海馬依存的な空間認知機能の評価する contextual fear conditioning test を用いた。新生ニューロン数の評価には免疫染色を用いた。

認知機能を調べた結果、放射線照射 6週間後においてのみ、コントロール群に比べて freezing time が有意に減少した。また放射線照射 4か月後では freezing time に有意な変化は見られなかった (Fig. 10B)。この結果から、放射線照射 6週間後には海馬依存的な認知機能に障害が見られる事が示唆され、さらにこの障害は放射線照射 4か月後には回復する事が分かった (Fig. 10B)。

次に、新生ニューロン数を調べた。新生ニューロンは神経幹細胞から分裂後 4-6週間経過すると海馬ネットワークに組み込まれ (Zhao et al., 2006; Ge et al., 2007; Toni et al., 2008; Denny et al., 2012)、海馬依存的な認知機能に関与する事が知られている (Denny et al., 2012)。これにより、本研究でも神経幹細胞から分裂後 6週間経過した新生ニューロン数を比較した。細胞の分裂時に取り込まれ、分裂細胞のマーカとなっている BrdU を灌流固定を行う 6週間前に投与し (Fig. 11A)、成熟ニューロンのマーカである NueN と BrdU との共染色を行い、BrdU+/NeuN+細胞を神経幹細胞から分裂後 6週間経過した新生ニューロンとみなした (Fig. 11B)。海馬 DG における BrdU+/NeuN+細胞数は、放射線照射 6週間後においてのみ、BrdU+/NeuN+細胞が有意に減少していた (Fig. 11D)。また、放射線照射 4か月後ではおおむね回復していた事が分かった (Fig. 11E)。これらの結果から、放射線照射 6週間後においてのみ、放射線照射による認知機能障害と新生ニューロン数の減少が見られる事が分かった。この結果から、放射線照射 6週間後に着目し、放射線照射による海馬神経活動の変化と海馬ネットワークの変化を解析した。

始めに、海馬神経活動の評価を Opto-fMRI により行った。新生ニューロンが存在する DG に光ファイバーを挿入し、DG に存在するニューロン(新生ニューロンと成熟ニューロン)の神経活動を光刺激により誘導した。そして誘導された神経活動を fMRI により解析した。まず、個体毎における光刺激における反応を解析した (Fig. 12)。コントロール群では DG を光刺激する事で海馬全体における BOLD 信号の有意な上昇がある領域が観察された (Fig. 12A)。照射群では DG のみの反応しか観察出来なかった (Fig. 12B)。次に集団解析を行い、個体間で共通して反応が見られた領域を解析した (Fig. 13A)。コントロール群では DG 刺激により、海馬全体の神経活動が見られたのに対し、新生ニューロン数が減少している照射群では DG のみの活動が見られ、CA3領域の神経活動は見られなかった (Fig. 13A)。光刺激による神経活動は BOLD 信号の上昇した割合によって表す事が出来る。BOLD 信号の変化率 (神経活動の強さ)は CA3 領域で有意に減少していた (Fig. 13B)。次に、BOLD 信

号の経時的な変化を解析した (Fig. 14)。コントロール群では DG と CA3 領域において、光刺激による BOLD 信号の上昇が見られたのに対し (Fig. 14A, C)、照射群では CA3 領域において BOLD 信号の上昇が見られなかった (Fig. 14B, D)。次に海馬における領域を細かく分けて、その BOLD 信号の変化率を解析した (Fig. 15)。本研究の撮像方法では DG-CA3 領域において MRI 画像は 37voxels からなる。DG-CA3 領域を 37 個の領域に分けて (Fig. 15A)、各領域の神経活動の大きさ (BOLD 信号の変化率)を求めた。CA3 領域は DG に近い方から、proximal-CA3, medial-CA3, distal-CA3 と分けた。その結果、DG における神経活動の大きさには変化がなかったが、CA3 領域では proximal-CA3、medial-CA3、distal-CA3 の順に神経活動の大きさが減少している事が分かった (Fig. 15B)。これらの結果から、放射線照射により、DG で誘導した神経活動は CA3 領域で減少する事が示唆された。

次に、頭部への放射線照射により、海馬ネットワーク変化を調べるため、放射線照射から 6 週間後に rsfMRI を行った。新生ニューロンが存在する海馬 DG に着目し、海馬 DG に球形の ROI を置き、この ROI に対するコネクションがある領域を求めた。その結果、コントロール群では海馬全体にコネクションが見られたのに対し、照射群では DG のみにコネクションが見られ、CA3 領域にはコネクションが見られなかった (Fig. 16A)。DG-CA3 間のコネクションの強さを求めた結果、放射線照射により、DG-CA3 間のコネクションの強さが有意に減少している事が分かった (Fig. 16B)。この結果から放射線照射により、海馬ネットワークにおいて、DG-CA3 間のコネクションが減少する事が分かった。新生ニューロンの細胞体は海馬 DG に存在し、その軸索は CA3 領域に伸ばしている事から、この DG-CA3 間のコネクションの減少には新生ニューロンの減少が関与している事が推測できる。さらに、Opto-fMRI の結果と合わせると、DG に存在しているニューロン (新生ニューロンと成熟ニューロン)からの信号は CA3 領域に伝達されにくくなったのではないかと推測できる。

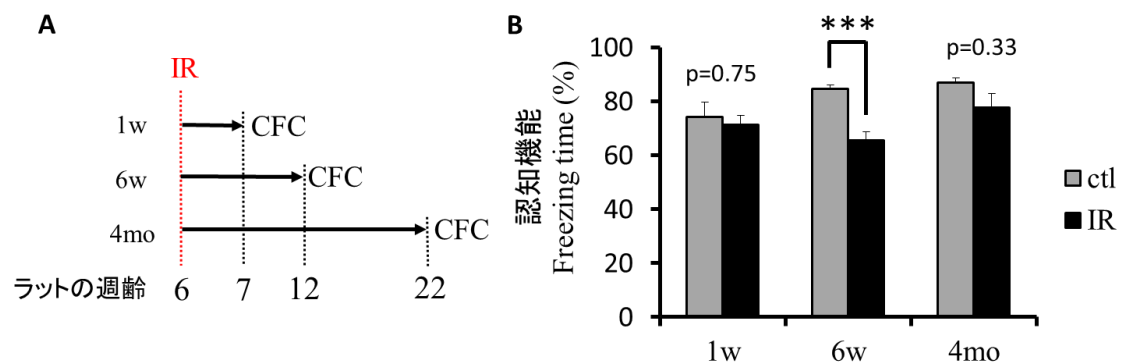


Fig. 10 ラットにおける放射線照射による認知機能の変化

(A) 実験のタイムスケジュール。6 週齢のラットに放射線 (10 Gy) を照射し (IR)、その 1 週間後 (1w, 各群 n=10)、6 週間後 (6w, 各群 n=20)、そして 4 ヶ月後 (4mo, 各群 n=10) に海馬依存的な認知機能を調べるための行動実験 (contextual fear conditioning test, CFC test) を行った。(B) CFC test の結果を示す。放射線照射 6 週間後においてのみ、コントロール群 (ctl) に比べ、照射群 (IR) で freezing time が減少した。\*\*\* $p < 0.001$  (student's t test)

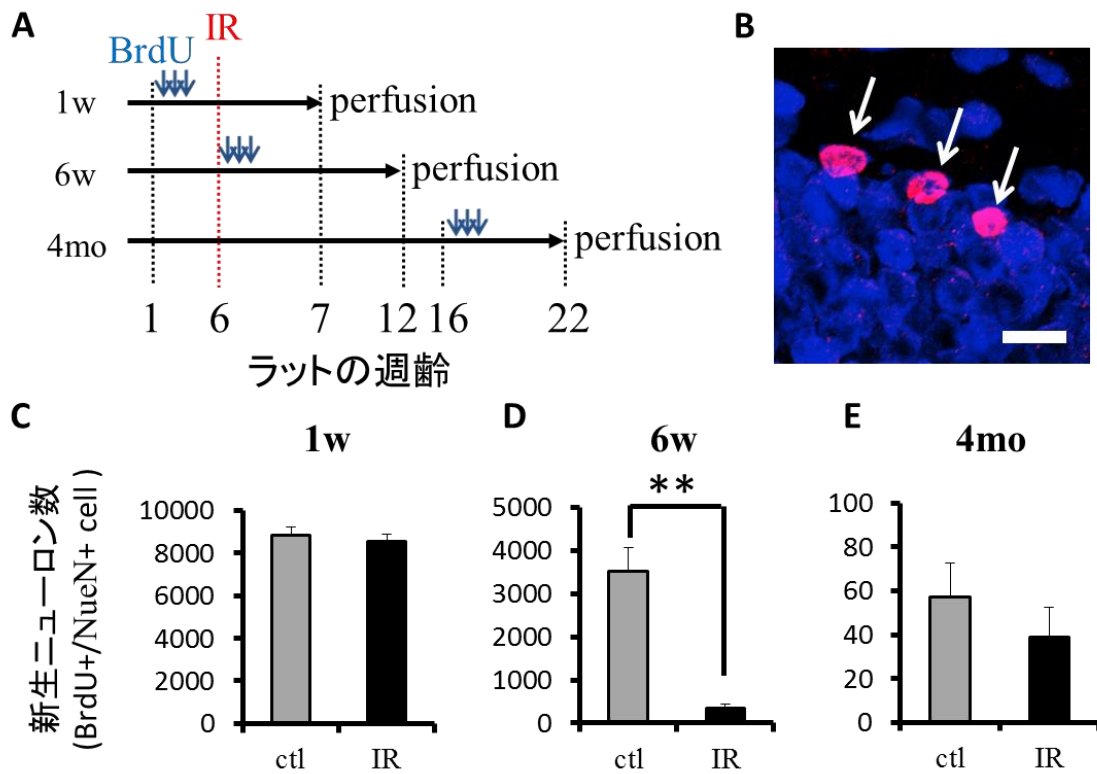


Fig. 11 ラットにおける放射線照射による新生ニューロン数の変化

(A) 実験のタイムスケジュール。6 週齢のラットに放射線 (10 Gy) を照射し (IR)、その 1 週間後 (1w, 各群 n=5)、6 週間後 (6w, 各群 n=5)、そして 4 ヶ月後 (4mo, 各群 n=5) に灌流固定 (perfusion) を行い、免疫染色を行った。BrdU は perfusion を行う 6 週間前に投与した。(B) 矢印は分裂後 6 週間経過した新生ニューロンを示す。青: NeuN、赤: BrdU、scale bar: 5 μm。(C-D) 放射線照射から 1w (C)、6w (D)、4mo (E) 後の新生ニューロンの数 (BrdU+/NeuN+細胞) を比較した。放射線照射 6 週間後においてのみ、放射線照射により、新生ニューロンの数が減少した。\*\*p<0.01 (student's t test)

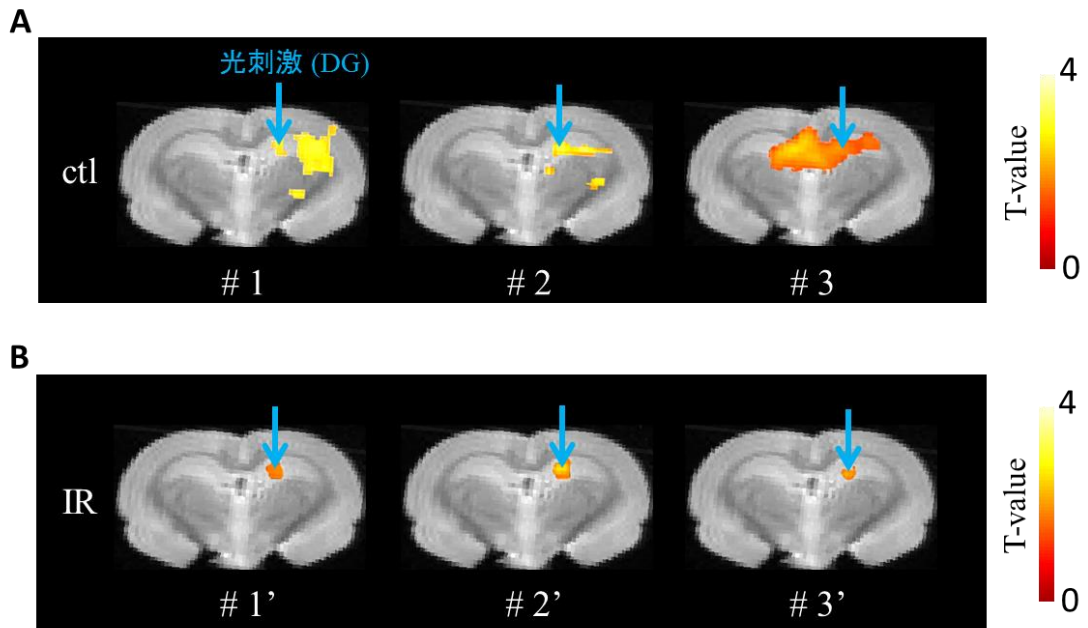


Fig. 12 ラット Opto-fMRI 解析による放射線照射 6 週間後の海馬ネットワーク変化 (個体解析)

Opto-fMRI の個体毎にける 3 例の反応を示す (A; ctl, B; IR)。右側の海馬 DG に光刺激 (矢印)を行った時の海馬神経活動を示す。光刺激をしていない時に比べ、光刺激をしている時の方が BOLD 信号が有意に上昇している領域をカラーバー (t 値)で示した。有意水準は One sample t-test により、uncorrected  $p < 0.01$  (ctl)と  $p < 0.05$  (IR)のレベルで示した。ラット脳はブレグマから -3.3 mm の距離にあるスライスを示した。Fig. 12A のデータは Fig. 4A, D, G と同じデータである。

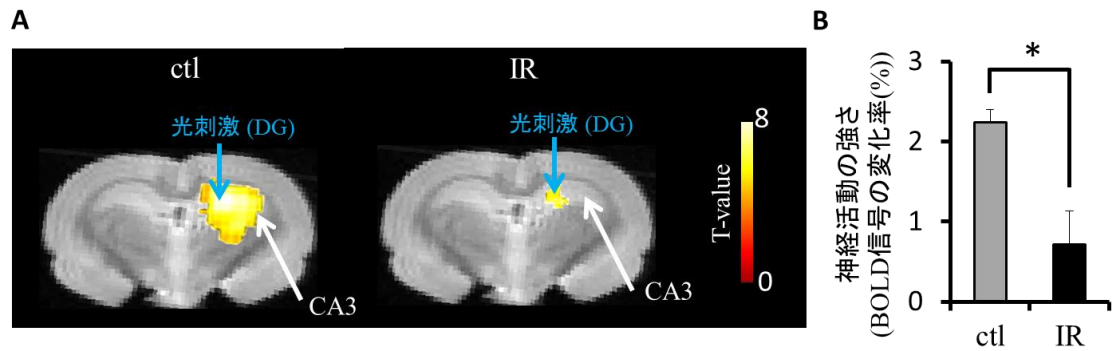


Fig. 13 ラット Opto-fMRI 解析による放射線照射 6 週間後の海馬ネットワーク変化 (集団解析)

(A) Opto-fMRI の結果を示す。右側の海馬 DG に光刺激を行った時の海馬神経活動を示す。ctl 群 (n=6)では海馬全体の神経活動が見られたのに対し、IR 群 (n=6)では DG のみの神経活動であった。有意水準は One sample t-test により、uncorrected  $p < 0.001$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。ラットの脳スライスはブレグマから -3.3 mm の距離にあるスライスを示した。(B) CA3 領域における BOLD 信号の変化率を神経活動の大きさとして解析した。CA3 における神経活動の大きさは放射線照射により減少した。\* $p < 0.05$  (student's t test)



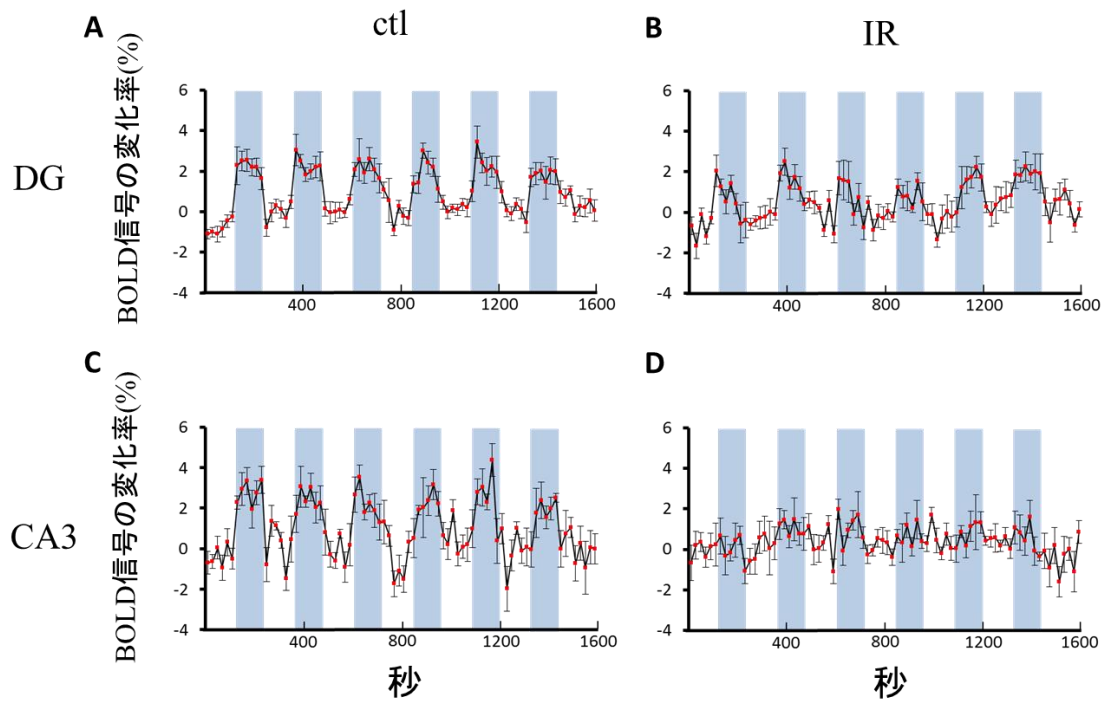


Fig. 14 ラット Opto-fMRI 解析による放射線照射 6 週間後の BOLD 変化  
 DG を光刺激した時の DG (A, B)と CA3 (C, D)における BOLD 信号の経時的な変化を示す。  
 青色の領域は DG を光刺激している時間を示す。放射線照射により、CA3 における IR 群の  
 BOLD 信号の変化は弱くなった。

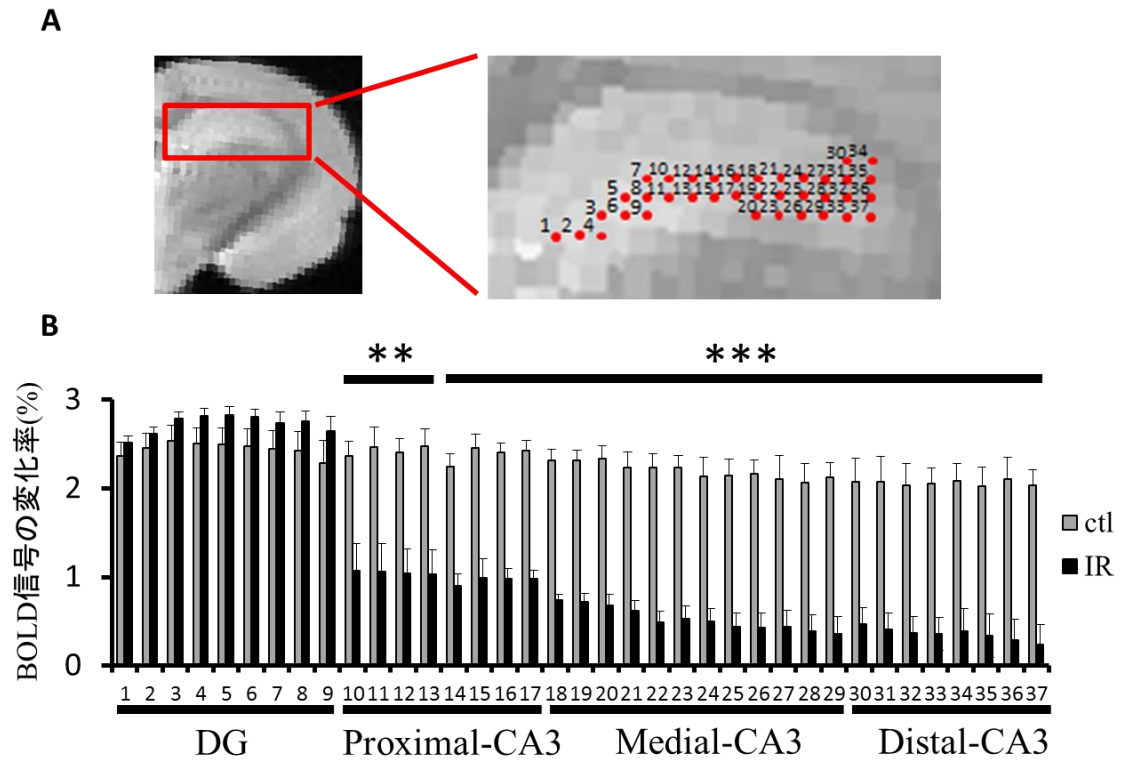


Fig. 15 ラット Opto-fMRI 解析による放射線照射 6 週間後の BOLD 変化  
 (A) 海馬 DG から CA3 の領域を 37 voxel に分け、各 voxel における BOLD 信号の変化率を求めた (B) No. 1-9 を DG、No. 10-17 を proximal-CA3、No. 18-29 を medial-CA3、No. 30-37 を distal-CA3 として区別した。proximal、medial、distal の順に DG から離れていく。DG では BOLD 信号の変化率に変化はなく、CA3 では DG から離れる程、BOLD 信号の変化率が減少した。 $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  (student's t test, vs 各 voxel 番号に対する ctl)

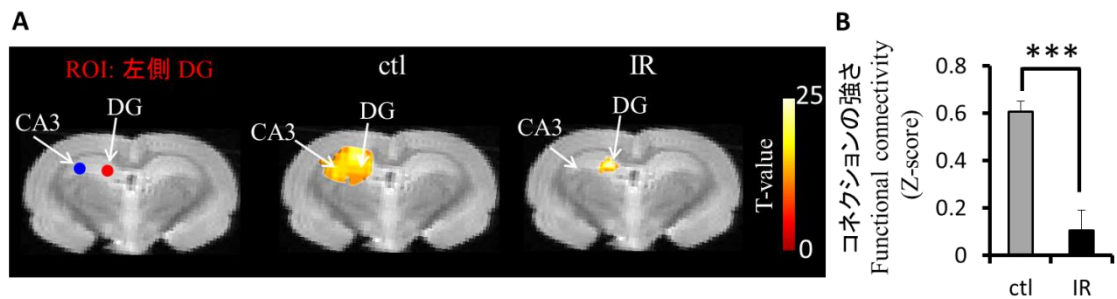


Fig. 16 ラット rsfMRI 解析による放射線照射 6 週間後の海馬ネットワーク変化  
 (A) rsfMRI の結果を示す。海馬 DG に半径 0.5 mm の球形の ROI を置いた (左パネル)。その ROI に対して、コネクシオンがある領域をコントロール群 (ctl, 中パネル, n=6) と照射群 (IR, 右パネル, n=6) で示す。ctl 群では ROI に対するコネクシオンが海馬全体で見られたのに対し、IR 群では DG のみであった。有意水準は One sample t-test により、corrected  $p < 0.05$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。ラットの脳スライスはブレグマから -3.3 mm の距離にあるスライスを示した。(B) DG (赤い ROI) と CA3 (青い ROI) のコネクシオンの強さ (Z-score による functional connectivity) を示す。DG と CA3 のコネクシオンの強さは放射線照射により減少した。\*\*\* $p < 0.001$  (student's t test)

## 2-4. 考察

放射線照射により海馬依存的な認知記憶機能が低下する事は多くの研究から分かっており、その原因が新生ニューロン数の減少ではないかと考えられている (Rola et al., 2004; Saxe et al., 2006; Deng et al., 2009; Kitamura et al., 2009)。実際に、放射線により神経新生を阻害した研究や遺伝的に神経新生を阻害したトランスジェニック動物による研究により調べられている (Kitamura et al., 2009; Saxe et al., 2006; Amador et al., 2011; Sahay et al., 2011)。この研究において認知記憶機能の評価には、本研究でも用いた Contextual fear conditioning (CFC) test や Morris Water Maze (MWM) test が用いられている (Kitamura et al., 2009; Saxe et al., 2006)。どちらの行動実験も海馬依存的な空間認知記憶を評価する試験である。

本研究ではガンマ線 10 Gy を用いて神経新生を阻害した。10 Gy は神経幹細胞または、神経前駆細胞の数を減少させるのに十分な線量である (Peissner et al., 1999; Kitamura et al., 2009; Fuss et al., 2010)。実際に、チミジンのホモログであり分裂細胞マーカーである BrdU と成熟神経細胞のマーカーである NeuN を共染色した結果から、新生ニューロン数の低下が見られ、CFC test を用いてガンマ線照射 6 週間後の海馬依存的な認知記憶機能を調べたところ、認知記憶機能の低下が見られた。しかし放射線照射 1 週間後では有意な認知記憶障害は見られなかった。神経幹細胞から成熟神経細胞になるまでには 4-6 週間かかることされている (Zhao et al., 2006; Ge et al., 2007; Toni et al., 2008)。また、分化してから、4-6 週間後に海馬ネットワークに機能的に組み込まれる事が分かっている (Zhao et al., 2006; Ge et al., 2007; Toni et al., 2008)。本研究の結果から、放射線照射 1 週間後の段階で、6 週齢の新生ニューロン数に影響が見られなかった事から、機能的に海馬ネットワークに組み込まれている新生ニューロン数に影響が無かったため、認知機能障害が見られなかったと考えられる。これに対して、放射線照射 6 週間後では 6 週齢の新生ニューロン数の低下により、認知記憶に影響が生じたと考えられる。他の研究グループにおいても、放射線照射から 4-6 週間後においてのみ、認知機能障害が見られる事が報告され、さらに、神経新生を遺伝的に阻害した Tg マウスを用いた実験でも同様の結果が報告されている (Denny et al., 2012)。これらの事から、本研究で得られた結果は海馬依存的な認知記憶障害が新生ニューロン数の低下であるという仮説を強く支持する結果である。

放射線照射 4 ヶ月後では、有意な認知機能障害は見られなかった。この事から、放射線照射による認知機能障害は一過性の障害である事が示唆された。さらに、6 週齢の新生ニューロン数もコントロール群と有意な差が無かった事から、放射線照射による新生ニューロン数の減少も一過性の変化である事が示唆された。この放射線照射による認知機能障害の回復には神経幹細胞が関与しているのではないかと考えられる。神経幹細胞は 2 種類の細胞が存在する事が知られている (Dranovsky et al., 2011)。分裂を活発に行い、神経前駆細胞に分化する幹細胞と、分裂を行わず、休止期の状態である幹細胞の 2 種類である。当研

究の過去の研究から、放射線照射により、分裂を活発に行っている神経幹細胞が減少するが、休止期にいる神経幹細胞の数には影響が無い事が示唆されている(今岡修士論文、2012)。この事から、本研究においても放射線照射により、休止期にいる神経幹細胞が生き残り、4ヶ月後には新生ニューロンに分化し、新生ニューロンが機能を果たせたため、認知機能には影響が現れなくなったのではないかと考えられる。

放射線照射 6 週間後では海馬依存的な認知機能障害と新生ニューロン数の低下が観察された。さらに、この状態の時、海馬ネットワークが変化している事が rsfMRI の実験結果から分かった。特に新生ニューロンが存在する DG とその投射先である CA3 とのコネクションが減少していた。さらに Opto-fMRI の結果から、DG の神経活動を誘導した時に、CA3 領域の神経活動が減少する事も分かった。これらの結果から、放射線照射により、DG から発信された信号は CA3 領域に伝達されにくくなったのではないかと推測される。

多くの研究より、新生ニューロンは成熟ニューロンと比べて発火の閾値が低い事が知られている(Doetsch et al., 2005; Ge et al., 2008; Mongiant et al., 2009)。また、DG の顆粒細胞の発火は同調発火を行っている傾向が強い事が示唆されている(Mohns et al., 2008; Lacefield et al., 2012)。この事と本研究で得られ結果を合わせて、次のように考察した。新生ニューロンは成熟ニューロンと比べ、発火の閾値が低い事から、DG への入力に対して、成熟ニューロンよりも信号が伝達され易くなっている。そして、成熟ニューロンよりも早く信号を受けた新生ニューロンはより優先的に CA3 領域に信号を伝達しているのではないかと考えられる。また新生ニューロンは海馬歯状回門(hilus)に存在する抑制性の介在ニューロンに働きかけ、この介在ニューロンが DG に存在する顆粒細胞を抑制し、同調発火の秩序を保っている。しかしながら放射線照射群では、新生ニューロンの数が減少したため、抑制性の介在ニューロンへの入力が弱まり、結果として DG での同調発火の秩序が保たれなくなり、CA3 への信号が低下したと考えている。よって、新生ニューロンは自分自身の発火により、CA3 領域への信号伝達を調節し、また抑制性の介在ニューロンを介して DG における顆粒細胞の発火を調節し、DG-CA3 間の伝達を調節しているのではないかと考察した。

第二章では、ラットの頭部に新生ニューロンの増殖を十分に阻害できる放射線線量を照射する事で、その 6 週間後に認知機能障害と新生ニューロン数の減少が起きていた。この認知機能障害と新生ニューロン数の低下は、一過的な障害である事が示唆され、放射線照射 4 ヶ月後には回復している事が分かった。また、認知機能障害と新生ニューロン数の低下が起こっている放射線照射 6 週間後では、海馬において DG-CA3 間のネットワークと神経活動が減少している事が分かった。

しかし、ここで、一つの問題がある。一般的にヒトの fMRI 研究では脳全体におけるネットワーク解析であるグローバルネットワーク解析が可能である。しかし、本研究で行ったラットの fMRI 研究では、撮像範囲が狭く脳全体のネットワーク解析が出来ない。さらに海馬全体での解析も難しい。これにより、動物実験から得られた結果では、臨床研究には応

用し難いという問題が生じる。本研究で用いた 4.7 tesla の MRI 装置では空間分解能、時間分解能、信号値が低く、fMRI 解析を行うのに十分な脳全体の fMRI 画像を得る事が難しい。本研究の目的は、放射線照射による海馬ネットワーク変化を動物実験により解析し、その結果を用いて、ヒトの海馬ネットワークを解析する事である。しかし、本研究のラットの実験結果ではその目的を達成する事は難しい。そこで、超高磁場 NMR 磁石を用いて fMRI を行う事を考えた。超高磁場 NMR 磁石を用いた MRI 装置は空間分解能、時間分解能、信号値が高く、撮像範囲も広くする事が可能である。従って、超高磁場 NMR 磁石を用いて fMRI 実験を行えば、脳全体のネットワークを解析できるのではないかと考えた。この超高磁場 NMR 磁石を用いた fMRI 技術の開発は次の第三章で行った。

## 第三章

### 超高磁場 NMR 磁石を用いたマウス fMRI 技術の開発

### 3-1. 序論

第二章で行ったラットの rsfMRI 実験結果から、頭部への放射線照射によって、海馬ネットワークに変化が起きる事が分かった。しかし、撮像範囲が狭く、時間分解能が低いため臨床試験への応用が難しいという問題が生じた。そこで、この問題を解決するため、超高磁場 NMR 磁石 (600 MHz, 14.1 tesla)を用いる事を考えた。

しかし、NMR 磁石を用いて MRI を行うためには二つ目の問題が生じてくる。NMR 磁石のサンプルをいれる空間 (ボア)は一般的なMRI装置より狭くなり、生きた動物を入れて、MRI を行う事は難しい。さらに NMR 磁石を用いて MRI を行うためには、NMR 磁石以外に、シムコイル、傾斜磁場コイル、RF コイルが必要となる。既存のコイルを用いて NMR 磁石による MRI 装置を構築した場合、動物が入る空間は極端に狭くなる。そこで、この問題を解決するために、取り外しが可能な傾斜磁場コイルと RF コイルを出来るだけ薄く作製する事により、動物が入る空間を広くした。これにより、サイズの小さいマウスを用いた fMRI 実験が可能となり、さらにマウス脳のグローバルネットワーク解析が可能となるのではないかと考えた。動物が入る空間はマウスが入るのに十分な空間しかなく、ラットを用いて fMRI 実験を行う事は難しい。

第三章では、マウス脳のグローバルネットワーク解析を行うために、NMR 磁石を用いてマウス fMRI 技術の開発を目的とした。そのため、傾斜磁場コイルと RF コイルの作製を行い、マウス fMRI を行うための条件検討を行った。

#### 3-1-1. MRI の原理

MRI はプロトンの NMR を利用し、その信号を三次元的な画像に構築する技術である。プロトンは静磁場に置かれた時、ある一定の周期(プロトンは 42.58 MHz/tesla である。この周波数をラーモア周波数と言う)で歳差運動をしている。静磁場が強い程、この周期は大きくなる。静磁場に置かれている時の周波数と同じ周波数の電磁波(RF パルス)をプロトンに与える事で、プロトンは核磁気共鳴現象を起し、エネルギーが励起して信号を放出する。この時に放出された信号を NMR 信号または free induction decay (FID)信号と呼ぶ。この信号に傾斜磁場コイルを用いて三次元的な情報を与え、RF コイルにより捉えられた FID 信号から三次元画像を構築する。

FID 信号に三次元的な情報を与えるためには傾斜磁場コイルが必要になる。傾斜磁場コイルは X, Y, Z 軸にそれぞれ傾斜磁場を発生させる事で NMR 信号に三次元的な情報を与える。FID 信号の励起時や受信時に傾斜磁場が印加されると、その信号の周波数や位相が変化する。この変化を捉える事により、FID 信号を三次元的に捉える事が出来る。

傾斜磁場コイルの X, Y, Z 軸はそれぞれ周波数エンコード傾斜磁場、位相エンコード傾斜磁場、スライス選択傾斜磁場と呼ばれている (第三章では axial 断面の画像を考えた時の条



件で解説する)。スライス選択傾斜磁場(Z 軸)はスライスの位置情報とスライスの厚さを決定している。FID 信号を励起させる時に、スライス選択傾斜磁場を発生させる事により、静磁場強度が変化し、その変化に伴い共鳴周波数が変化する。その周波数の違いにより、Z 軸方向の情報を与える事が出来る。周波数エンコード傾斜磁場(X 軸)は FID 信号を受信する際に発生させることで、傾斜磁場強度に伴い信号の周波数が変化する。その変化を利用して X 軸方向の情報を与える。位相エンコード傾斜磁場(Y 軸)は FID 信号を励起した後に発生させる事で、傾斜磁場強度に伴い信号の位相が変化する。その変化を利用して Y 軸方向の情報を与える。

### 3-1-2. MRI の構造

MRI の構造は幾つもの要素が複合的に成り立っている (Fig. 17)。まず磁石に当たる部分では様々な構造が層状になってできている。MRI の主磁場は静磁場磁石である。例えば本研究で用いた 14.1 tesla MRI 装置の 14.1 tesla は静磁場磁石の磁場強度を示している。現在使用されている静磁場磁石には大きく分けて 2 種類あり、永久磁石と超伝導磁石がある。永久磁石はコストが易く漏洩磁場も少ないが、低磁場 (0.3~1.0 tesla 程度) 磁石しか存在しないため本研究では使用していない。本研究で使用した超伝導磁石は高磁場 (10 tesla 以下) から超高磁場 (10 tesla 以上) の磁石を作製可能であるが、コストが高くなってしまふ欠点がある。超伝導磁石はコイルを液体ヘリウムで超低温に冷やすことで、電気抵抗をなくし、磁場を半永久的に持続させる事が出来る。さらに液体ヘリウムの蒸発を防ぐため、液体ヘリウムを液体窒素の層で覆っている。

静磁場磁石の内側には静磁場の歪みを補正し、均一に保つためのシムコイルがある。シムコイルはコイルに微弱な電流を流す事で微弱な磁場を形成し、静磁場の均一性を補正する。シムコイルが作り出す磁場には一次関数的(X, Y, Z)な磁場、二次関数的( $X^2$ ,  $Y^2$ ,  $Z^2$ )な磁場、高次関数的( $X^3$ ,  $Y^3$ ,  $Z^3$ ,  $Z^4$ ,  $Z^5$ ,  $XZ$ ,  $YZ$ ,  $XY$ ,  $ZXY$ ,  $XZ^2$ ,  $YZ^2$ ,  $X^2-Y^2$ )な磁場がある。このシムコイルは独立したシステムから調節される。

シムコイルのさらに内側には傾斜磁場コイルがある。傾斜磁場コイルについては 3-1-3 の項目で詳しく説明する。コンピュータ制御されたオペレーションシステムにより画像を得るためのシーケンス (シーケンスについては 3-1-5 の項目で詳しく説明する) を起動させ、そのシーケンスに沿って、パルスプログラマーがどの傾斜磁場コイルにいつ、どれだけの電流を流すのかを制御している。

傾斜磁場コイルのさらに内側には高周波コイル (Radio frequency コイル; RF コイル)がある。RF コイルについては 3-1-4 の項目で詳しく説明する。RF コイルの内側には撮像したいサンプルを配置する空間がある。RF コイルは傾斜磁場コイルの制御と同様にシーケンスに沿ってパルスプログラマーがいつどれだけの RF パルスを発生させるのかを制御している。さらにサンプルから得た MRI 信号はプリアンプにより増幅され、トランシーバー

を介してコンピュータに送られ、画像が構成される。

シム調節システム、RF 調節システムを NMR コンソールと呼び、NMR コンソールに傾斜磁場調節システムを合わせたシステムを MRI コンソールと呼ぶ。

### 3-1-3. 傾斜磁場コイルについて

傾斜磁場コイルは MRI 内で傾斜磁場を発生させ、発生した傾斜磁場強度の違いにより X, Y, Z 軸方向の情報を与えるためのコイルである。一般的に傾斜磁場コイルは X, Y, Z コイルから成り、X, Y コイルは鞍型の平行 4 線コイル、Z コイルはマクスウェル型コイルと呼ばれているものを用いる (Hidaldo-Tobon et al., 2010)。

X コイルは鞍型コイルを Y 軸方向平行に 4 つ並べた形態を取り、電流は同じ方向に流す。磁場は右ネジの法則により形成され、コイル中央では相反する向きの磁場形成により磁場は相殺され、また中央から離れる程、相殺される磁場は弱くなる。これにより X 軸方向に傾斜磁場が生まれる。流す電流が強くなればなる程、発生する傾斜磁場は強くなる。Y コイルは X コイルと同様の形態を取り、X コイルに対して 90° 回転させる事で Y 軸方向の傾斜磁場を発生させる。Z コイルは円形コイルを対に配置させた形態を取る。電流は対を成すコイルそれぞれに逆方向の電流を流す事でコイル面に垂直(Z 軸方向)で左右対称な傾斜磁場を発生させる。

傾斜磁場コイルを作製する際に考慮しなければならない大きな問題がある。渦電流(eddy current)の問題である。渦電流は、導体が受ける磁場が変化した時に、その導体内で電磁誘導により発生する誘導電流の事を指す。MRI 内の導体では、主に静磁場コイルの冷却層、RF コイル、傾斜磁場コイル、シムコイル、導線、サンプルなどから渦電流が発生する。特に傾斜磁場コイルで発生した渦電流は、発生した傾斜磁場を打ち消す方向に磁場を形成するため、傾斜磁場が弱められてしまう。さらに傾斜磁場の発生を切る時には、切られた傾斜磁場を存続させる方向に渦電流による磁場が発生するため、傾斜磁場の消去に時間が掛かってしまう。MRI 画像を撮像する際には、数  $\mu$  秒から数 m 秒単位で傾斜磁場の on/off を入れ替える必要がある。しかし渦電流発生に伴う磁場の発生により、その傾斜磁場の強度や on/off を入れ替える時間に変化が生じてしまう。これにより撮像した画像には様々なアーチファクト、信号値の変化、ノイズの増大などが生じてしまう。そのため、傾斜磁場の作製にはこの渦電流の発生を如何にして抑えるかが大きな問題になってくる。

渦電流は抑える仕組みとして 2 種類の方法がある。一つ目は前強調法 (pre-emphasis) である (Fig. 18)。渦電流発生による磁場の形成によって影響を受ける磁場傾斜が弱まってしまう事を前提に考え、傾斜磁場を発生させるための電流を強く流す事で、渦電流の影響を弱くする方法である。二つ目には傾斜磁場遮蔽法(アクティブシールド法)がある (Fig. 23)。従来の傾斜磁場コイル(イメージングコイル)の外側に同様なコイルを設置し、イメージングコイルとは反対の電流を流す事で、反対の傾斜磁場を発生させ、イメージングコイルの外

側に傾斜磁場が漏れ出さないようにシールドする方法である。本研究では、両方の方法を用いて、渦電流の抑制を検討した。

#### 3-1-4. RF コイルについて

RF コイルは主に送信コイルと受信コイルとしての2つの役割を持っている。送信コイルは FID 信号を励起させるために高周波パルス(RF パルス)を出し、そしてプロトンが発した FID 信号を受信コイルにて受け取る。送信コイルと受信コイルをそれぞれ独立した2つのコイルを使用する事も可能だが、本研究ではサンプルスペースの確保のため、送受信コイルとして一つの RF コイルを使用した。

RF コイルの形状は様々あり、ソレノイド型、サドル型、バードケージ型、サーフェース型などがある。ソレノイド型、サドル型、バードケージ型はサンプルを囲う様に配置され、信号の検出領域は均一になるが、信号値は小さいという欠点がある。そのため、本研究ではサーフェース型(表面型)の RF コイルを選択した。サーフェース型の RF コイルはサンプルの上方に配置され、RF コイルに近いほど信号値は高くなるという特徴がある。しかし、RF コイルから離れる程、信号値は小さくなり、全体として均一な撮像を得る事は難しい。しかし、fMRI のような撮像方法では画像の均一性より、信号値の高さの方が重要視されるため、本研究ではサーフェース型を選択した。

RF コイルにはコイル部位だけではなくコイルのチューニングとマッチングをする機構も必要になる。FID 信号を励起させ受信するためには、RF コイルの周波数とプロトンの共鳴周波数を合わせなければならない。本研究では 600 MHz (42.58 MHz/tesla × 14.1 tesla から算出される)の静磁場磁石を使用しているため、RF コイルも 600 MHz に合わせなければならない。さらに RF コイルを 50 Ω にマッチングを取る必要がある。しかし、サンプルの大きさや RF コイルとの相対位置が変化すると毎にチューニングとマッチングがずれてしまうため、サンプル毎にチューニングとマッチングを補正する必要がある。そこで RF コイルには可変式コンデンサーが二つ付いており、このコンデンサーを調節する事でチューニングとマッチングの補正を行っている。

#### 3-1-5. シークエンスについて

シーケンスとは、MRI 画像を得るために、RF パルスや傾斜磁場を”いつ”、”どれだけ”印加するのかを決定したプログラムの事を指す。MRI ではシーケンスの数だけ様々な画像を得る事ができる。この項目では本研究で使用した Gradient echo 法 (GRE)、Spin echo 法 (SE)、Echo planner imaging 法(EPI)の3種類について説明する。

MRI において一番基礎のシーケンスとなっているのは Spin echo 法である。プロトンを励起させるために RF パルス (90° パルス)を掛け、FID 信号を発生させる。この後に傾

斜磁場を発生させ、信号に位置情報を加える。しかし、 $90^\circ$  パルスにより励起された信号の位相は徐々に揃わなくなる。そこで  $180^\circ$  パルスを印加する事で、再び位相が揃い信号が大きくなる。この信号をスピネコー信号と呼ぶ。Spin echo 法はアーチファクトがすくなく、均一画像を得やすい事から、解剖画像の撮像に適している。この Spin echo 法を改善したシーケンスが第四章で解剖画像の撮像に用いた TurboRARE シーケンスである。

この Spin echo 法に対して、Gradient echo 法は  $180^\circ$  パルスを用いず、傾斜磁場の印加により信号を発生させる方法である。Spin echo 法と同様に RF パルス ( $90^\circ$  パルス)を掛け、FID 信号を発生させる。この後に傾斜磁場を発生させ、信号に位置情報を加える。この時に周波数エンコードにあたる傾斜磁場を印加する事で、信号を大きくしている。この信号をグラジエントエコー信号と呼ぶ。Gradient echo 法は Spin echo 法に対して、 $180^\circ$  パルスを用いず、傾斜磁場によりエコー信号を得るため、磁場の不均一に影響され易いという欠点があるが、撮像時間を短縮する事ができる。さらに Gradient echo 法は Spin echo 法とは違い、FID 信号をそのまま計測することから、この信号を T2 スター信号と呼ぶ事もある。この T2 スター信号は fMRI の BOLD 信号となり、神経活動と関連した信号となる。このため Gradient echo 法は Spin echo 法より、BOLD 信号を検出しやすい手法である。この Gradient echo 法をさらに改善したシーケンスに fast low-angle shot (FLASH) シーケンスがある。このシーケンスは RF パルスを  $90^\circ$  パルスではなく、角度を小さくする事で、撮像時間をさらに短縮する事が出来る。この角度を flip angle と呼ぶ。Gradient echo 法は fMRI 解析に用いられる様に、高速撮像に適している。

EPI 法は Gradient echo 法よりもさらに高速で撮像するシーケンスである。一度 RF パルス ( $90^\circ$  パルス)を印加してから、傾斜磁場の高速スイッチングにより、多くのエコー信号を得るため、画像取得が早くなる。さらに RF パルスを多用しないため、T2 スター信号が強く反映された画像となる。しかし、磁場の均一性や渦電流発生による傾斜磁場の乱れにより、多くのアーチファクトが現れてしまう欠点もある。fMRI 解析には FLASH シーケンスや EPI シーケンスが使用される。従来では FLASH シーケンスを用いて fMRI 解析を行ってきたが、EPI シーケンスの開発により、EPI シーケンスを使用する事が一般的になってきた。EPI シーケンスは FLASH シーケンスに比べ、撮像時間が短く、さらに BOLD 信号の感受性が高い。このため、fMRI 解析には一番 EPI 法が適していると考えられている。

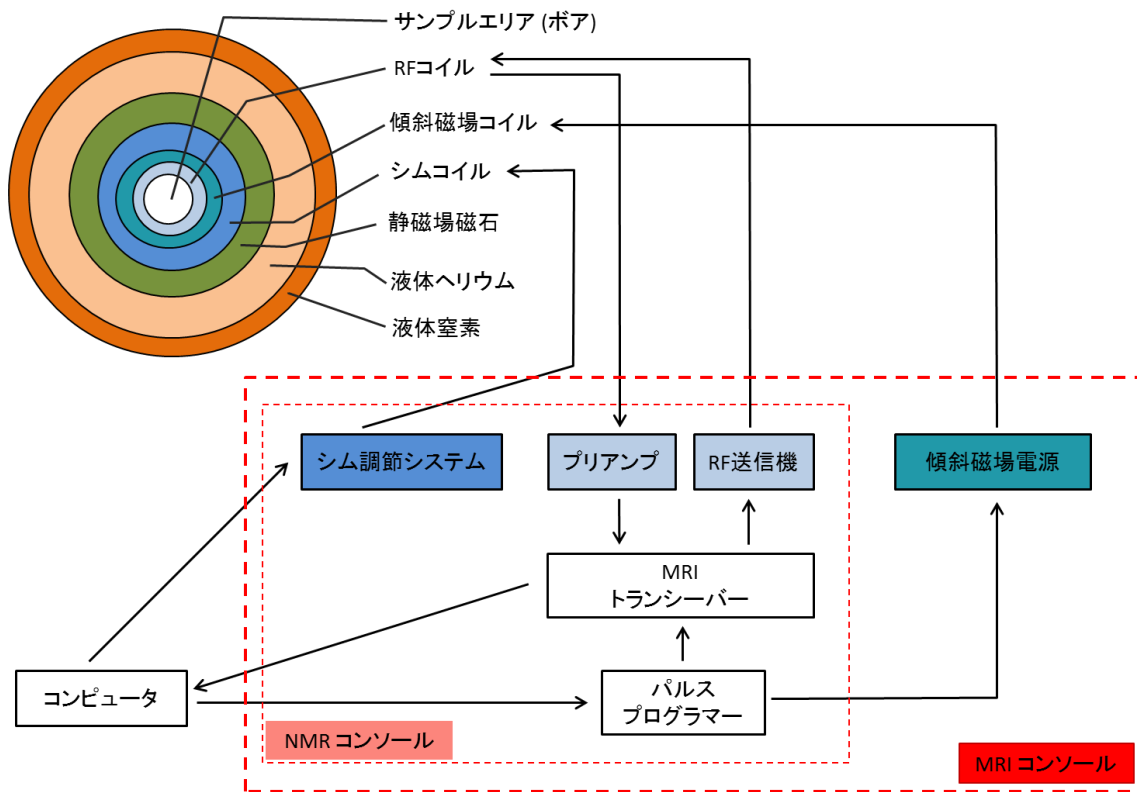


Fig. 17 MRI の構造について

MRI の基本は静磁場磁石である。この静磁場を保つため、静磁場磁石の外側には液体ヘリウム層と液体窒素の層がある。静磁場磁石の内側には、磁場の均一性を保つシムコイル、位置情報を形成する傾斜磁場コイル、信号を励起、受信する RF コイルがある。一番内側がサンプルが入る空間 (ボア) になる。これらのコイルはコンピュータにより、デジタル制御されている。シム調節と RF 調節システムを NMR コンソールと呼び、NMR コンソールと傾斜磁場調節システムを合わせた MRI コンソールと呼ぶ。

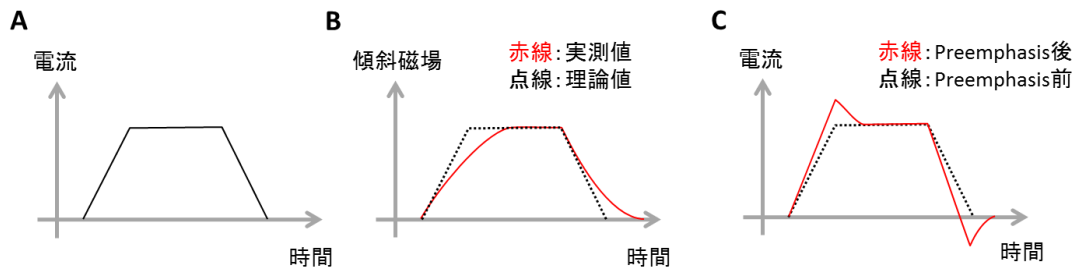


Fig. 18 前強調法 (pre-emphasis) について

(A)のように傾斜磁場コイルに電流を流す時、渦電流が発生していなければ、(B)の点線のような傾斜磁場が発生する。しかし、渦電流が発生する事により、(B)の赤線のような傾斜磁場の発生になってしまう。傾斜磁場の立ち上がりが遅く成り、さらに傾斜磁場の消去も遅くなる。そこで、(C)の赤線のように予め電流を強めに流す事で、渦電流の影響を弱くする。

## 3-2. 方法

### 3-2-1. 傾斜磁場コイルの作製

傾斜磁場コイルの設計は全て Tesla Engineering 社 (United Kingdom)が行い、作製はテクノ電気工業株式会社 (Japan)が行った。作製した傾斜磁場コイルは Fig. 20 に示した。

本研究で用いた傾斜磁場コイルはマウスを固定出来るスペースを設けて、かつそのコイルにルームシムコイルが取り付けられた静磁場磁石の中 (ルームシムコイルの内径 35 mm) に収まる様に設計しなければならない。この傾斜磁場コイルの設計、作製において一番重要な事は、限られた空間の中に必要な要素を盛り込むため、ミリ単位の設計、作製精度が必要とされる事である。

他の研究グループが作製した傾斜磁場コイル (Hidaldo-Tobon et al., 2010)と Micro imaging system (Micro5 system; Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を参考にし、傾斜磁場コイルの線材の巻きパターンとパラメータを設計した。Micro5 system のパラメータは Table 1 に示した。このパラメータを元に傾斜磁場コイルのパラメータを設定した (Table 2)。傾斜磁場コイルの X, Y コイルは鞍型の平行 4 線コイルで設計し、また Z コイルはマクスウェル型コイルで設計した。線材の巻きパターンは Fig. 19 の様な配置で巻き、筒状に形成した。傾斜磁場コイルの線材には、銅線ではなく、銅板を用いた。銅線では厚みが生まれてしまい、傾斜磁場コイルの内径が小さくなってしまうため、ボアの空間を確保する事が出来ない。また、銅線では強度が弱くなり、傾斜磁場コイルが発する振動に耐えられない可能性がある。そこで、薄い銅板を用いて、線材の巻きパターンを銅板からくり抜く事で、傾斜磁場コイルを作製した。これにより、傾斜磁場コイルの各層の厚みを抑える事ができ、さらに強度を高める事ができた。

傾斜磁場コイルには、渦電流を抑制するため、アクティブシールドコイルを設けた。画像を得るためのイメージングコイル (X, Y, Z コイル)3 層に加え、アクティブシールド (X, Y, Z)コイル 3 層を設ける事で傾斜磁場コイルの内径が 24 mm になってしまい、サンプルスペース (ボア)が狭くなってしまう。そこで本研究ではイメージングコイルとアクティブシールドコイルを合わせた 6 層コイルとイメージングコイルだけの 3 層コイルを設計し (Fig. 22)、どちらの傾斜磁場コイルが fMRI に適しているのかを検討する所から始めた。6 層コイルは外径 39mm、内径 24 mm である。また 3 層コイルは外径 39 mm、内径 32 mm である。もしアクティブシールドコイルが無くても fMRI が可能であれば、アクティブシールドコイルの大きさ分だけ、サンプルスペースを広げることができる。この事により、より大きいマウスが固定でき、また fMRI のための課題を課す装置を導入する事も可能となる。作製した 6 層コイルのパラメータは Table 3 に示した。3 層コイルのパラメータは測定していない。

傾斜磁場コイルの設計、作製に関して、次に重要になってくる事は温度管理である。傾

斜磁場コイルはマイクロ秒単位による電流のスイッチングを行うため、振動が発生し、これにより熱が発生してしまう。そこで各軸の傾斜磁場コイルを樹脂により固定し、振動を少なくした。さらに傾斜磁場コイルの温度計測をモニタリングするため、白金温度プローブ (Pt100) を傾斜磁場コイルに挿入した。従来の傾斜磁場コイルには水冷または空冷により、傾斜磁場コイルを冷やす機構が備わっている。しかし、本研究で作製した傾斜磁場コイルには限られた空間しかないため、冷却機構は設けていない。そのため、作製した傾斜磁場コイルを用いての長時間撮像は行わないようにした。また傾斜磁場電源の制御システム BGU II (Bruker) には温度制御システムが搭載されており、測定温度が  $50^{\circ}$  を超えた場合、電源供給が自動的に止まる様になっている。本研究中において、温度が高温になる様な事は無かった。

撮像時は傾斜磁場コイルを静磁場磁石の中心に固定しなければならない。そこで傾斜磁場コイルの台座を作製し、傾斜磁場コイルを静磁場磁石の中心に固定出来るようにした。この台座の設計と作製はテクノ電気工業株式会社 (Japan) が行った。台座の部品には全て非磁性の部品を用い、台座はアクリルパイプを用いて作製した。静磁場磁石の中心は挿入口から 46.5 mm の深さにあるため、傾斜磁場コイルの中心が挿入口から 46.5 mm の深さに来る様に台座の長さを設計した。台座は挿入口で真鍮製のネジにより固定した。傾斜磁場コイルと傾斜磁場電源を継ぐための配線にはカラー銅線を使用した。傾斜磁場コイルの各コイルからはプラスマイナスの 2 本の配線が伸びており、6 層コイル (イメージングコイル 3 層とアクティブシールドコイル 3 層) の計 12 本と温度プローブの配線 2 本が伸びている。各配線のプラスマイナスや X, Y, Z の配線が混同しないようにカラー分けを行った。台座の作製において最も重要になる部分は、傾斜磁場コイルと台座の繋ぎ目と、MRI コンソールと傾斜磁場コイルを繋ぐ配線の繋ぎ目である。傾斜磁場コイルに流す電流のスイッチングを  $\mu$  秒から m 秒単位の速さで行う事から、振動が発生する。この振動により、それぞれの繋ぎ目が外れてしまう。このため、継続した MRI 画像の撮像が困難になり、fMRI の様な継続撮像では大きな問題となる。そこで、傾斜磁場と台座の繋ぎ目は、お互いの方向からネジを用いて、互いに固定されるように固定した。傾斜磁場コイルと配線の接続はハンダによる接続ではなく、圧着端子による接続を用いた。さらに、台座の壁面に配線コードが通る溝を掘り、傾斜磁場コイルの配線コードをその溝に埋め込む事で、配線コードに負荷される振動を抑え、繋ぎ目に負荷される振動を弱めた。

### 3-2-2. RF コイルの作製

RF コイルの設計、製作は高島製作所株式会社 (Japan) が行った。RF コイルは送受信用コイルとして設計し、マウス固定用ベッドと一体化させた。

本件研究では fMRI 研究を目的としているため、信号検出が強いサーフェース型 (表面型)



を採用した。RF コイルの土台は繊維強化プラスチック(Fiber Reinforced Plastics, FRP)を用いた。信号を送受信するループコイル部位は銅線を用いて 17×15 mm の大きさにした。さらにループコイル部位にはコンデンサーを用いて電氣的に二分割し、高周波帯域において周波数が安定する様にした。また可変式位コンデンサーを 2 つ用いて、600 MHz にチューニング、50 Ω にマッチング出来る様にした。作製した RF コイルを Fig. 21 に示した。

本研究において、RF コイル設計時に一番重要な事は、RF コイルの同軸ケーブルとチューニング、マッチングをどのように合わせるかという事である。RF コイルは傾斜磁場コイルの内部に設置するため、限られたスペースしかない。しかし、RF コイルと MRI コンソールとを繋ぐ同軸ケーブルを通すスペースとチューニング、マッチング用の棒を通すスペースが必要である。同軸ケーブルが傾斜磁場コイル内部を通る様に設計した場合、同軸ケーブルがノイズの原因となり画像にアーチファクトが出てしまう。また、傾斜磁場コイルの配線もあるため、静磁場磁石の下方からのアプローチは困難である。そのため、同軸ケーブルは静磁場磁石の上方から伸ばし、MRI コンソールと接続した。

次に RF コイルのチューニング、マッチングである。RF コイルにおいて 600 MHz の高周波はチューニングが安定しにくいという特性がある。そのため、チューニング、マッチングを行った直後に、傾斜磁場コイルと RF コイルを静磁場磁石への挿入する事は、チューニングが狂ってしまう原因になる。この問題を解決するため、チューニング、マッチングは挿入後でも調節出来る様に設計した。可変コンデンサーの可変部位には調節用の棒を取り付けられる様にし、静磁場磁石の上方から調節可能な仕組みに設計した。これにより、チューニング、マッチングを安定的に設定出来るようになった。チューニング、マッチングは MRI 撮像前にネットワークアナライザー (FieldFox RF analyzer, N9912A4/6GHz, Agilent Technologies, CA, US)を用いて調節した。

RF コイルにはマウスを固定するためのベッドを設置した。ベッド部位はプラスチックにより作製し、マウス固定用にバイトバーを設けた。通常、動物の固定にはイヤーバーも用いるが、限られた空間しかないため、本研究で用いたマウス固定用ベッドにはイヤーバーは設置しなかった。イヤーバーと RF コイルの位置はマウスの大きさに合わせて可変出来る様になっている。またサンプルスペースは 24 mm ととても狭く、マウスを固定する事により、空間がなくなり、空気の流れはほぼ起こらない。そのため、MRI 撮像時にマウスが呼吸困難になる可能性が考えられる。fMRI 信号にはヘモグロビンの変化が関与しているため、酸素不足は fMRI を行うにあたり、重要な問題である。そこで外部から空気を送る仕組みを設置した。コンプレッサーから圧縮された空気をシリコンチューブを通して、マウスの鼻元に供給した。

RF コイルには RF シールドを設置する必要がある。RF コイル自身が作り出す磁場が傾斜磁場や静磁場に干渉されない様に、傾斜磁場コイルと RF コイルの間にシールドを設ける必要がある。シールドの材質として、一般的に銅が用いられる。薄い銅シートを筒状に成型し、傾斜磁場コイルと RF コイルの間に設置した。さらに銅シートが重なる領域は電氣的

に絶縁するため、銅シートにポリイミドで片面が被膜されている銅シート（フレキシブルプリント回路用銅張積層板、F-30VC1、銅箔 18  $\mu\text{m}$ 、ポリイミド 7  $\mu\text{m}$ 、Nikkan Industries Co., Ltd., Japan)を用いた。薄いアクリルシートを 90×72.36 mm の大きさに切り、このアクリルシートに銅シートを接着させ、直径 24 mm の筒状にした。

### 3-2-3. 14.1tesla MRI 装置の構築

本研究では 600 MHz-NMR 装置を応用し、超高磁場 14.1 tesla MRI 装置を構築して実験を行った (Fig. 22)。この MRI 装置を構成している要素を下に記す。

MRI のメイン部位である静磁場磁石は 600 MHz-NMR spectrometer magnet (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を用いた。シムコイルはルームシム (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を用いた。シムコイルの外径は 50 mm、内径は 35 mm である。NMR コンソールは 600 MHz 対応の AVANCE I (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を用いた。この NMR コンソールに傾斜磁場コイルの電源を加える事で MRI コンソールとした。傾斜磁場コイルの電源には、X, Y, Z のそれぞれの電源に BAFPA40 (最大電流 40 A) (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を計 3 機用いた。この電源の制御には BGU II (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を使用した。MRI 装置のオペレーションシステムには ParaVision5.1 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を用いた。

傾斜磁場コイルと RF コイルは用途によって 2 種類のコイルを使い分けた。本研究で作製した傾斜磁場コイルと RF コイルのシステム、または Micro imaging system (Micro5 system; Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を用いた。Micro5 は傾斜磁場コイルと RF コイルが一体となった既存のイメージングプローブである。Micro5 システムのパラメータは Table 3 に示した。この Micro5 のサンプルスペースは 10 mm であり、生きているマウスを入れる事ができない。本研究では、作製した傾斜磁場コイルと RF コイルのシステムのコントロール画像を得るために、Micro5 システムを用いた。

### 3-2-4. ファントムの作製

MRI におけるファントム、形、サイズが既知である物体を指し、このファントムを用いて作製した傾斜磁場コイルと RF コイルにより得られた MRI 画像の検討を行った。内径 12 mm の円筒型の物体を用いた。ファントムの内容物には、生理食塩水を用いた。Micro5 を用いる際のファントムには、内径 9 mm の NMR 管(Wilmad glass company, Inc., Buena, USA)に生理食塩水を入れた物を用いた。

### 3-2-5. MRI 撮像

作製した傾斜磁場コイルと RF コイルを用いて MRI を行う際には、上記 (3-2-4 の項目) のファントムとマウスを用いた。マウスは 7 週齢でメスの C57BL/6N マウスを用いた。マウスを麻酔する際は、ケタミン(三共株式会社, Tokyo, Japan)を 100 mg/kg、キシラジン(バリエル薬品株式会社, Tokyo, Japan)を 25 mg/kg の濃度で筋肉注射により麻酔を導入した。Micro5 システムを用いる際は上記 (3-2-4 の項目)のファントムと単離したマウス脳を用いた。7 週齢のマウスを灌流固定し、脳を単離した後、PFA で 1 週間固定し、撮像を行った。

MRI シークエンスは 3 種類用いた。FLASH、EPI、2D-TurboRARE T2 を使用した。FLASH シークエンスは TR=51 ms, TE=3 ms, flip angle=10° , field of view=18 mm×18 mm, acquisition matrix=96×96, voxel size=0.18 mm×0.18 mm×0.35 mm, slice thickness=0.35 mm, slice number=8, time resolution=3.67 s のパラメータで行った。EPI は TR=2000 ms, TE=14 ms, flip angle=90° , field of view=18 mm×18 mm, acquisition matrix=96×96, voxel size=0.18 mm×0.18 mm×0.35 mm, slice thickness=0.35 mm, slice number=8, time resolution=2 s のパラメータで行った。2D-TurboRARE は TR=2500 ms, TE=33 ms, field of view=18 mm×18 mm, acquisition matrix=128×128, slice thickness=0.35 mm, slice number=8, average=4, scan time=4 min のパラメータで行った。

### 3-2-6. シグナル/ノイズ比の計測

シグナル/ノイズ比 (signal-noise ratio, SNR)は MRICron を用いて計測した。撮像した MRI 画像を用いて、画像の中心 (ファントム内の領域, A とする)と画像の左下 (ファントム外の領域, B とする)に球形の ROI を作製した。SNR は A の平均信号値から B の平均信号値を割る事で求めた。各画像を同様に 7 回撮像し、その 7 回分の SNR の平均を得た。

### 3-2-7. 前強調法による傾斜磁場コイルの調節

予め流す電流の強さは、傾斜磁場コイルの電源である BAFPA40 (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany)を用いて設定する。電流の強さはオシロスコープ (GDS-1000AU, Good Will Instrument, Taiwan)を用いて確認した。本研究では傾斜磁場の計測は直接行っておらず、渦電流による FID 信号の変化を計測する事で、渦電流による傾斜磁場への影響を評価した。渦電流による傾斜磁場への影響の評価はオペレーションシステムである ParaVision 5.1 に内蔵されているプログラムにより行う事が可能である。傾斜磁場を掛けてから RF パルスを掛け、FID 信号を発生させる間の時間を変える事で得られる FID 信号により評価した。傾斜磁場を掛けてから RF パルスを掛ける時間を 0.3、0.8、2.1、5.7、15.5、41.6、111.8、300 ミリ秒の 8 つに分けた。この 8 つに時間を分けて得られた FID 信号をフ

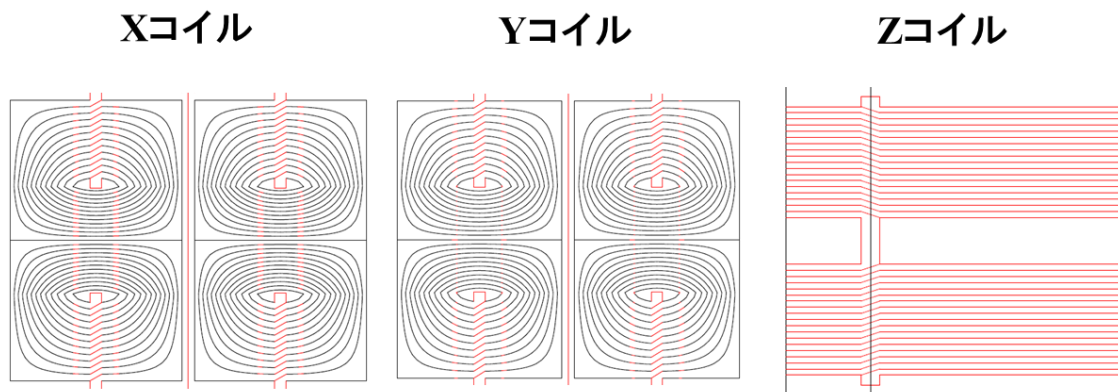
ーリエ変換により、信号の大きさを求めた。これらの解析は ParaVision 5.1 に内蔵されているプログラムを用いた。得られた 8 つの信号の大きさが揃えば、渦電流の発生が抑えられる事を意味し、揃わなければ、渦電流が発生している事を示す。もし揃わなければ、8 つの信号のうち、対応する信号における gain を調節する事で、前強調法の微調整が可能である。

### 3-2-8. rsfMRI

マウスは7週齢でメスの C57BL/6N マウスを 15 匹用いた。マウスに  $\alpha$ -chloralose (Sigma, 0.1 M boric acid, 30 %プロピレングリコールの溶液に溶解)を 50 mg/kg の濃度で腹腔投与し、麻酔を行った状態で実験を行った。

fMRI 撮像では FLASH シークエンスを用いて行った。1セッションにおけるシーケンスパラメータは次の通りである。TR=45 ms, TE=1.8 ms, flip angle=20°, field of view=18 mm × 18 mm, acquisition matrix=96 × 96, voxel size=0.18 mm × 0.18 mm × 0.35 mm, slice thickness=0.35 mm, slice number=8, volume number=120, time resolution=3.2 s, total scan time= 6 min 28 s。

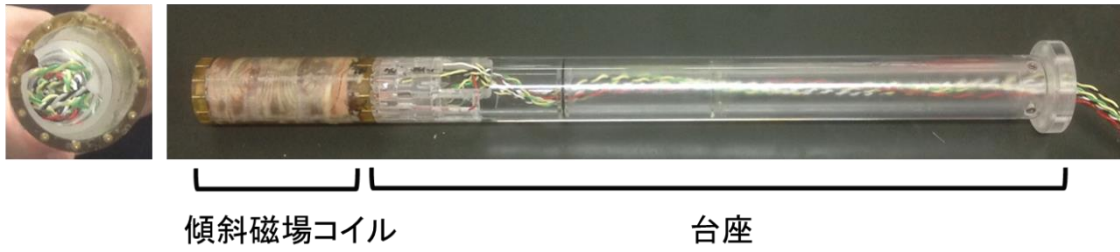
fMRI 解析には SPM8 を用いた。前処理に関する詳細は第四章 4-2-5 の項目で述べる。ROI は MRICron を用いて、手動により、右側海馬の ROI を作製した。その ROI を用いて FC 解析を行った。その後、集団解析により、共通にコネクションがある領域を解析した。



**Fig. 19** 傾斜磁場コイルにおける線材の巻きパターン

傾斜磁場コイルの X コイル、Y コイル、Z コイルにおける線材の巻きパターンを示す。この画像は Tesla Engineering 社 (United Kingdom)からの画像である。

### 3層傾斜磁場コイル



### 6層傾斜磁場コイル

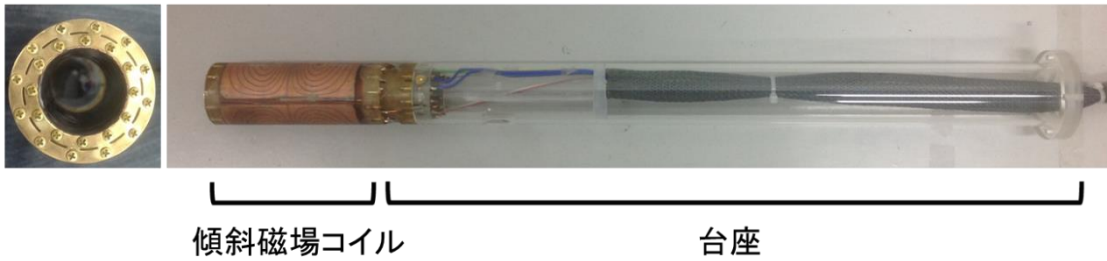


Fig. 20 作製した傾斜磁場コイル

3層の傾斜磁場コイルと6層の傾斜磁場コイルの写真を示す。上段が3層の傾斜磁場コイルを示し、下段が6層の傾斜磁場コイルを示す。左側の写真は傾斜磁場コイルを上面から見た写真を示し、右側の写真は傾斜磁場コイルを側面から見た写真を示す。

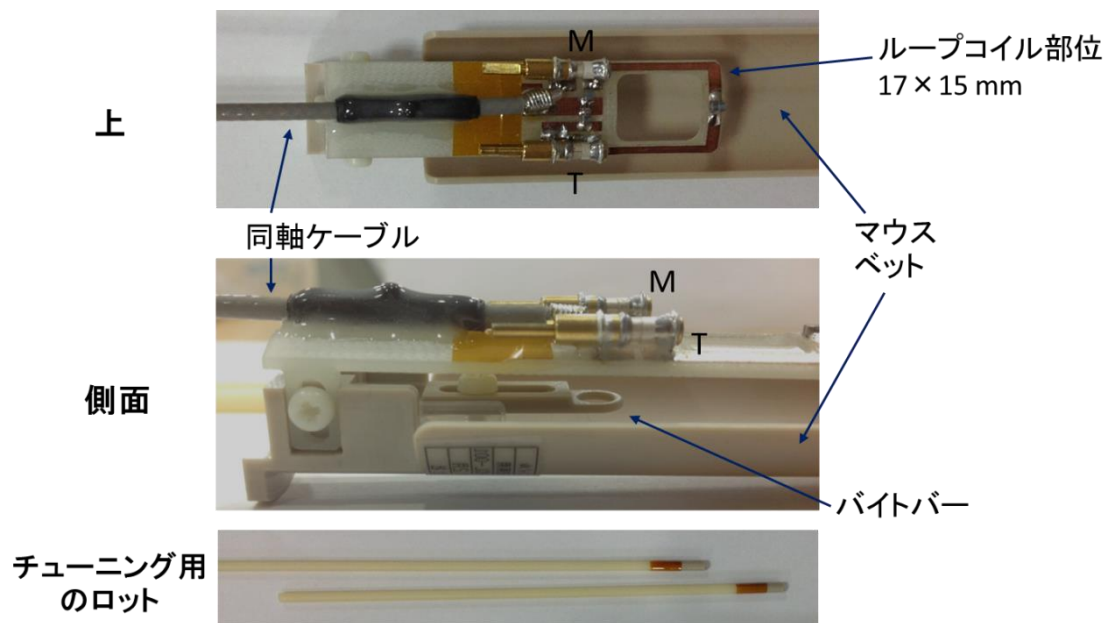


Fig. 21 作製した RF コイル

作製した RF コイルを示す。M はマッチング用の可変コンデンサーを示す。T はチューニング用の可変コンデンサーを示す。チューニング用のロッドを用いて可変コンデンサーの調節を行う。

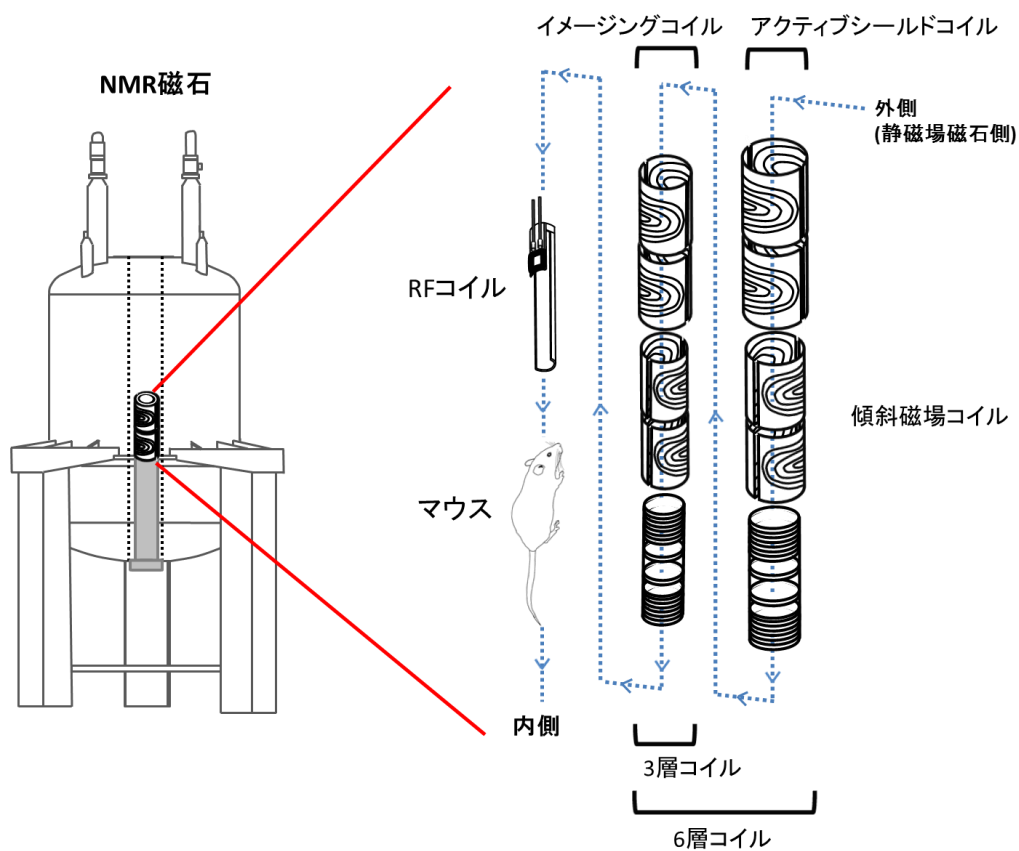


Fig. 22 NMR 磁石を用いたマウス MRI 装置の構築

傾斜磁場コイルの内側に RF コイルを置き、さらにその内側にマウスを固定する。これらのコイルを NMR 磁石の下側から挿入し、NMR 磁石に固定する。傾斜磁場コイルでは、内側に 3 層 (X、Y、Z コイル) からなるイメージングコイルがあり、その外側に 3 層 (X、Y、Z コイル) からなるアクティブシールドコイルがある。3 層コイルはイメージングコイルのみから成っており、6 層コイルはイメージングコイルとアクティブシールドコイルから成る。



Table 1 Micro5 system における傾斜磁場コイルのパラメータ

外径 (mm)	40
内径 (mm)	19
最大傾斜磁場強度 (mT/m)	2000
最大電流 (A)	40
抵抗値 (mΩ)	<120
半径 19 mm 球における傾斜磁場の直線性	≤ ±1.6%
インダクタンス (μH)	10-20

傾斜磁場コイルの直線性は半径 19 mm の球の空間において、傾斜磁場を発生させた時、発生した傾斜磁場の誤差を示す。

Table 2 Micro5 system を元に立案した 6 層傾斜磁場コイルのパラメータ

外径 (mm)	40
内径 (mm)	24
最大傾斜磁場強度 (mT/m)	1000
最大電流 (A)	40
抵抗値 (m $\Omega$ )	-
半径 15 mm 球における傾斜磁場の直線性	-
インダクタンス ( $\mu$ H)	-

抵抗値、傾斜磁場コイルの直線性、インダクタンスについては今回、基準値を設けてはいない。

Table 3 作製した6層コイルのパラメータ

	X コイル	Y コイル	Z コイル
最大傾斜磁場強度 (mT/m)	931	953	1019
最大電流 (A)	40	40	40
抵抗値 (mΩ)	110	90	90
半径 15 mm 球における傾斜磁場の直線性	-6.4~3.3%	-5.7~2.6%	-2.8~1.6%
インダクタンス (μH)	9.5	8	7.5

傾斜磁場コイルの直線性は半径 15 mm の球の空間において、傾斜磁場を発生させた時、発生した傾斜磁場の誤差を示す。

### 3-3. 結果

始めに、傾斜磁場コイルに設けたアクティブシールドコイルの必要性に関する検討を行った。シールドコイルの有無により、渦電流の発生が変化する。そこで、渦電流の発生に大きく影響を受ける EPI 画像を用いて、アクティブシールドコイルの必要性に関する検討を行った。渦電流が生じていれば、傾斜磁場が発生する際のスピードと大きさが弱くなり、これに伴い、EPI 画像に様々なアーチファクトが生じる。このアーチファクトの有無で渦電流の発生を評価した。さらに、画像のシグナル/ノイズ比 (signal-noise ratio, SNR) も評価の項目に加えた。SNR が高い程、ノイズが小さく、画像の質が高い事を意味する。EPI 画像に加えて、FLASH 画像も評価の対象に加えた。FLASH 画像と EPI 画像はどちらも fMRI に用いられる画像である。

傾斜磁場コイルにはアクティブシールドコイルが設けられた 6 層コイルとアクティブシールドコイルが設けていない 3 層コイルを用いて、アクティブシールドコイルの検討を行った。撮像対象は生理食塩水を封入したファントムを用いた。まず FLASH 画像では、3 層コイルと 6 層コイル共に画像を得る事が出来た (Fig. 23A)。しかし、SNR は 6 層コイルの方が高くなった (Fig. 23B)。3 層コイルの FLASH 画像はノイズが大きく、今後の fMRI 解析には不十分な画像であった (Fig. 23A)。EPI 画像では 6 層コイルのみで画像が得られた。3 層コイルの EPI 画像では不十分な画像であった。SNR に関しても、6 層コイルの方が高くなった (Fig. 23B)。これらの結果から、3 層コイルには大きな渦電流の発生がある事がわかり、また、傾斜磁場コイルにはアクティブシールドコイルが必要である事が分かった。これにより、3 層コイルを用いて、fMRI を行う事は難しいと思われる。次に、6 層コイルの EPI 画像と FLASH 画像を比較した際、EPI 画像では正確な球形になっておらず、歪んでいる事が分かった。この歪みのアーチファクトが発生した事から、6 層コイルにおいても渦電流の発生が示唆される。しかし、3 層コイルに比べ、6 層コイルではアーチファクトの発生はあるが、EPI 画像を取得出来る。この事から、6 層コイルのさらなる改善を行った。

6 層コイルを用いて、前強調法による渦電流の評価とその抑制を検討した。渦電流の評価には Bruker の MRI オペレーションシステムである ParaVision 5.1 に内蔵されているプログラムを用いた。傾斜磁場を発生させてから RF パルスが発生させる時間を遅らせた時に得られる FID 振動の強度により、渦電流の発生を評価した。8 種類の遅延時間を用いて得られた FID 信号の大きさが揃えば、渦電流が発生していない事を意味し、揃っていないならば、渦電流が発生している事を意味する。6 層コイルを用いて前強調法を行う前の渦電流発生を評価した結果、FID 信号の大きさが揃っていない事から、傾斜磁場コイルの X と Y コイルにおいて渦電流が発生している事が分かった (Fig. 24A)。Z コイルにおいては渦電流が発生していない事が分かった (Fig. 24A)。そこで、傾斜磁場コイルの X コイルと Y コイルにおいて前強調法による調節を行った。オシロスコープを用いて、予め流す電流量の計測を行った (Fig. 24B)。そして前強調法による調節を行った後に、先程と同様に渦電流の評価を

行った結果、渦電流の発生が抑えられた事が示唆された (Fig. 24A)。さらに、ファントムを用いて前強調法を行う前と後の MRI 画像を比較した (Fig. 25)。FLASH 画像ではアーチファクトは見られず、前強調法による変化は無かった。EPI 画像では歪みのアーチファクトが見られたが、前強調法によりそのアーチファクトは改善された。さらに解剖画像に用いる T2 画像を用いて評価した結果においても、前強調法によるアーチファクトの改善が見られた。

次に、マウス脳を用いて画像の評価を行った (Fig. 26)。画像のコントロールとして Micro5 システムにより得られた画像を用いた。6 層コイルと 3 層コイルでは麻酔をかけたマウスを用いてマウス脳の MRI 画像を得た。Micro5 システムでは *ex vivo* によるマウス脳の MRI 画像を得た。Micro5 システムにより得られた MRI 画像ではどの MRI 画像においても、ノイズが小さく、アーチファクトもなく、さらにコントラストが高い画像を得る事が出来た。6 層コイルによる FLASH 画像では全脳における MRI 画像を得る事が出来た (Fig. 27A)。ここでは、高信号画像を得るため、FLASH シークエンスの加算回数を 120 回に増やして撮像を行っている。しかし、Micro5 システムにより得た画像より、コントラストが高い画像を得る事は出来なかった。また、6 層コイルを用いた EPI 画像では、1 スライス分の脳画像は得る事が出来たが、全脳における EPI 画像の取得には至らなかった (Fig. 26)。3 層コイルでは、ノイズが大きく、アーチファクトも多い画像となった (Fig. 26)。これらの結果から、fMRI 撮像には 3 層コイルより 6 層コイルの方が適しているのではないかと考えられる。しかし、6 層コイルによる EPI 画像では、fMRI 解析に十分な画像は得られていない。また脳全体における EPI 画像も得られていない。EPI 画像を用いた fMRI 解析では、本研究の目的であるマウスのグローバルネットワーク解析を行う事が難しいと考えられる。そこで、本研究では 6 層コイルを用いて FLASH 画像による fMRI 解析を行うことを目指した。

次に、作製した 6 層コイルと RF コイルを用いて、FLASH 画像により fMRI 解析が可能かどうかの検討を行った。rsfMRI により、海馬のネットワークを検出する事により、fMRI 解析が可能かどうかを判断した。撮像に用いた FLASH シークエンスのパラメータは時間分解能と空間分解能を考慮して決定した。

右側海馬に ROI を置き、海馬とのコネクションがある領域を FC 解析により算出した。その結果、ROI を置いたスライス断面では海馬全体のコネクションを得る事ができた。さらに、後方海馬や中隔野とのコネクションも得る事が出来た (Fig. 27B)。この結果から、作製したコイルを用いて fMRI 解析が可能である事が示唆された。

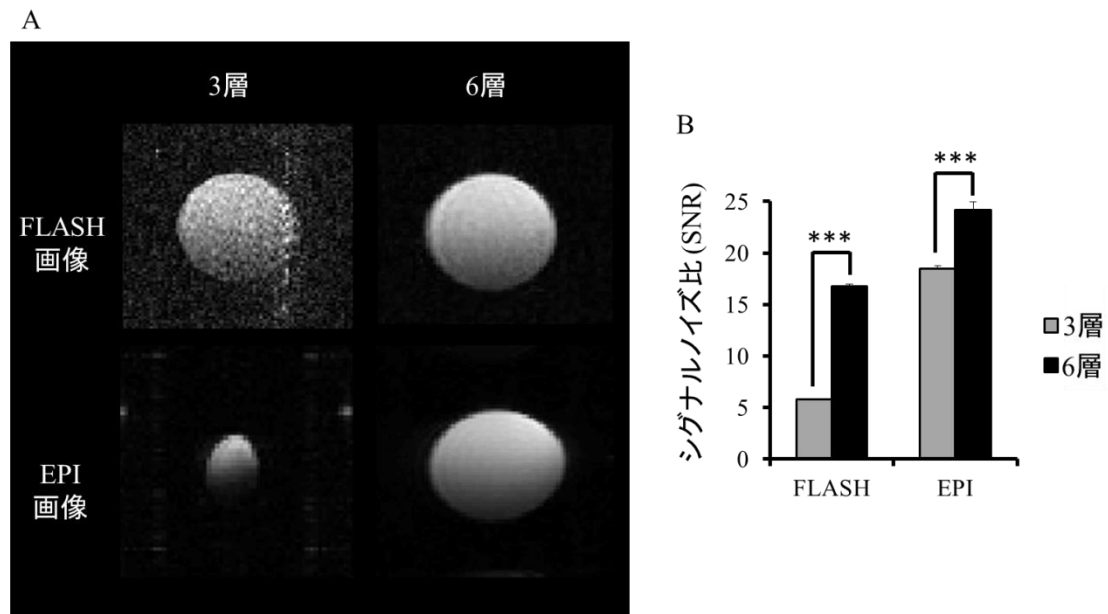


Fig. 23 アクティブシールドコイルの必要性について

(A) 3層コイルと6層コイルを用いてファントム画像を得た。FLASH画像とEPI画像を得た。3層コイルにおいて、FLASH画像ではノイズが多く、EPI画像では歪みのアーチファクトが大きくなった。6層コイルのEPI画像では歪みが少し見られた。(B) 各コイルを用いてFLASH画像とEPI画像のシグナルノイズ比 (signal-noise ratio, SNR)を比較した。6層コイルの方がSNRが有意に高い。\*\*\* $p < 0.001$  (student's t test)

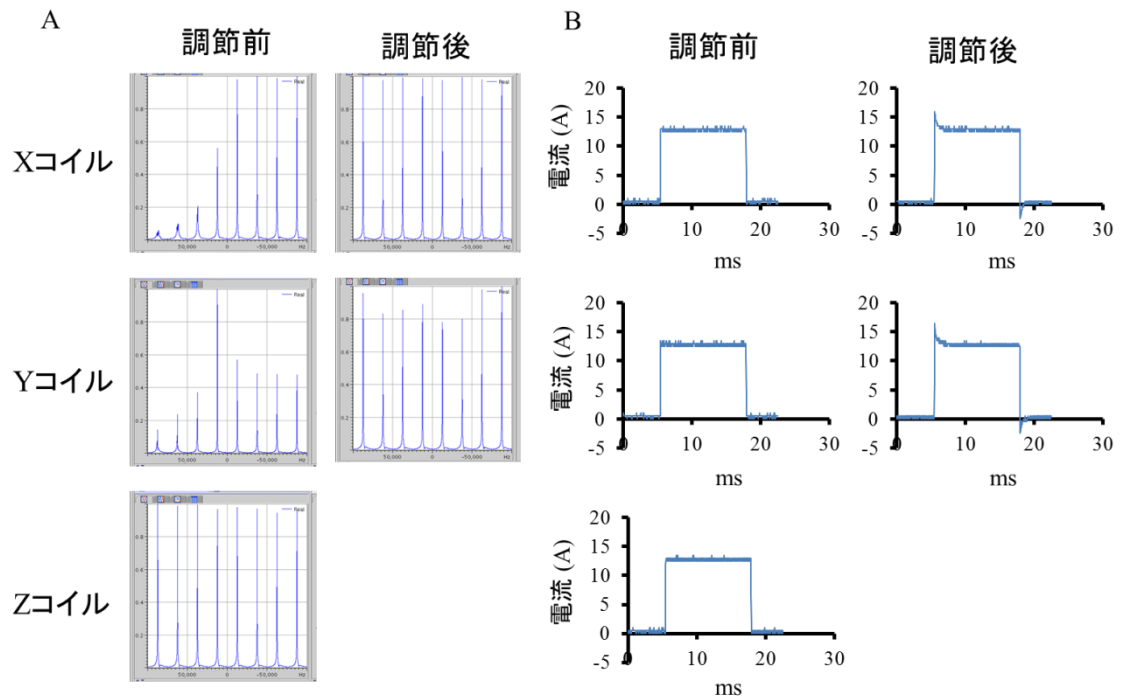


Fig. 24 前強調法による傾斜磁場コイルの調節

(A) MRI のオペレーションシステムである ParaVision 5.1 を用いて、渦電流の発生を評価した。傾斜磁場の発生から RF パルスを発生させる時間を 8 通りに遅延させ、その遅延後の FID 信号をフーリエ変換したグラフを示す。横軸は各遅延時間に対応している。縦軸は FID 信号の相対的な強度を表す。8 つの信号が揃う程、渦電流が発生していない事を示す。X コイルと Y コイルでは渦電流の発生が確認された。Z コイルでは発生していない事が分かった。前強調法による調節を X コイルと Y コイルで行った結果、渦電流の発生を抑制出来た。

(B) 前強調法による電流量の調節を行った。X コイルと Y コイルで行った。電流量はオシロスコープを用いて計測した。

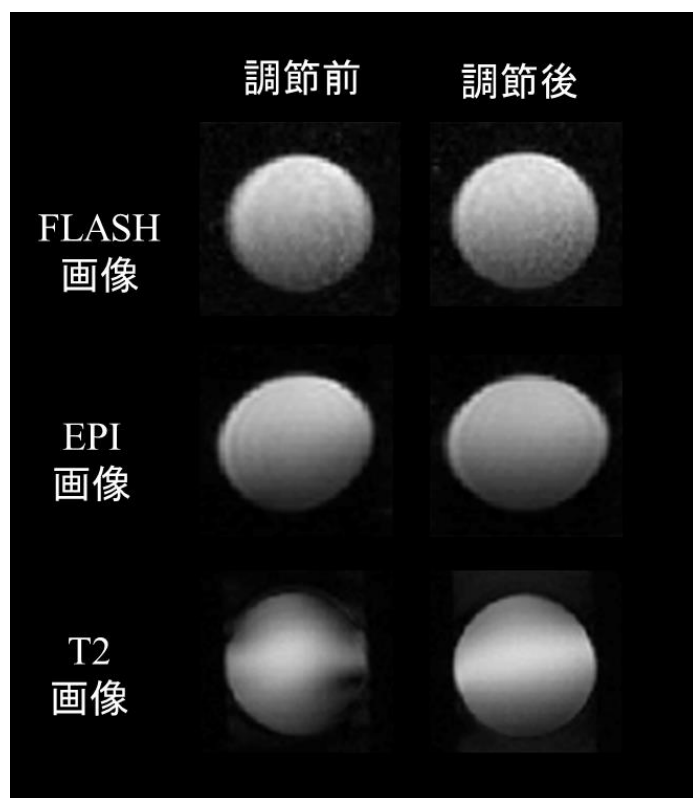


Fig. 25 前強調法によるファントム MRI 画像の比較

6層コイルで前強調法を行い、その前後でファントムの MRI 画像を得た。MRI 画像は FLASH 画像と EPI 画像と T2 画像を得た。FLASH 画像ではアーチファクトに影響はないが、EPI 画像と T2 画像ではアーチファクトの改善が見られた。



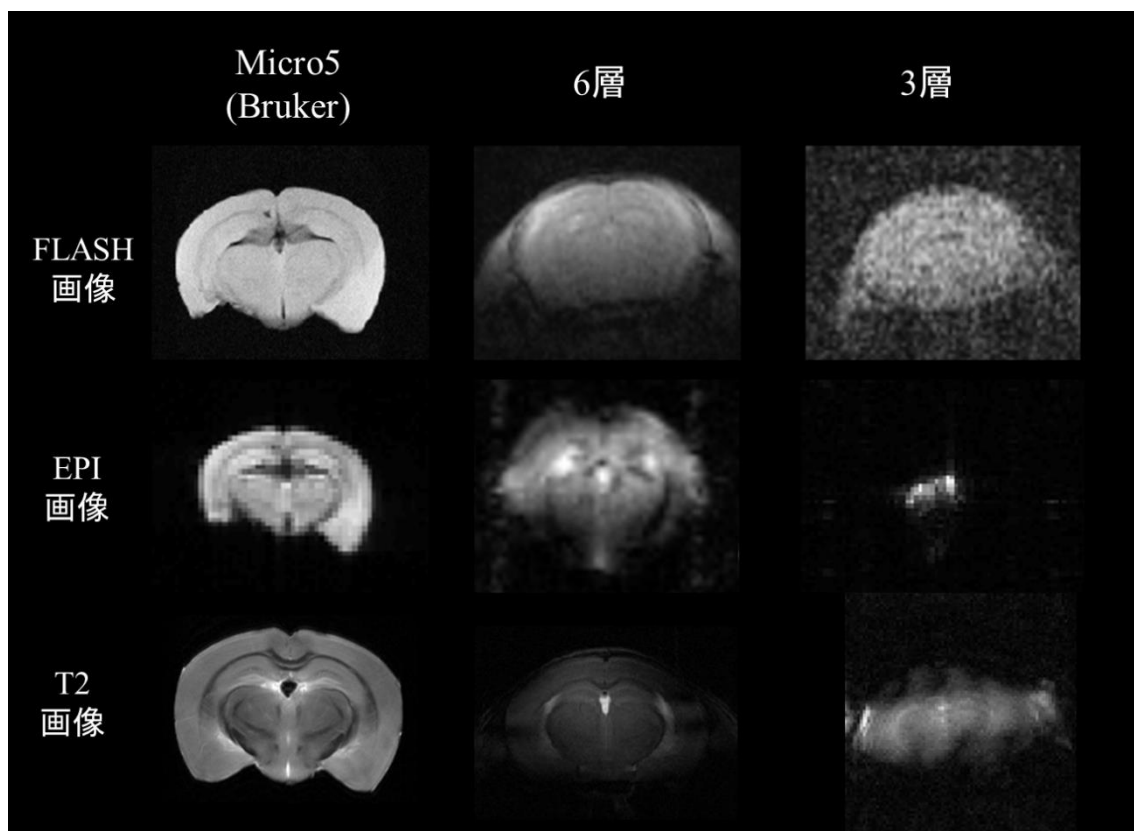


Fig. 26 マウス脳画像の取得

6層コイルと3層コイルを用いて、マウス脳のMRI画像を得た。MRI画像はFLASH画像とEPI画像とT2画像を得た。コントロール画像として、Micro5システムを用いてMRI画像を得た。6層コイルと3層コイルではin vivoで撮像を行った。Micro5システムではex vivoで画像を得た。6層コイルではEPI画像とT2画像にアーチファクトが多い。3層コイルではノイズが大きく、またアーチファクトも多い。

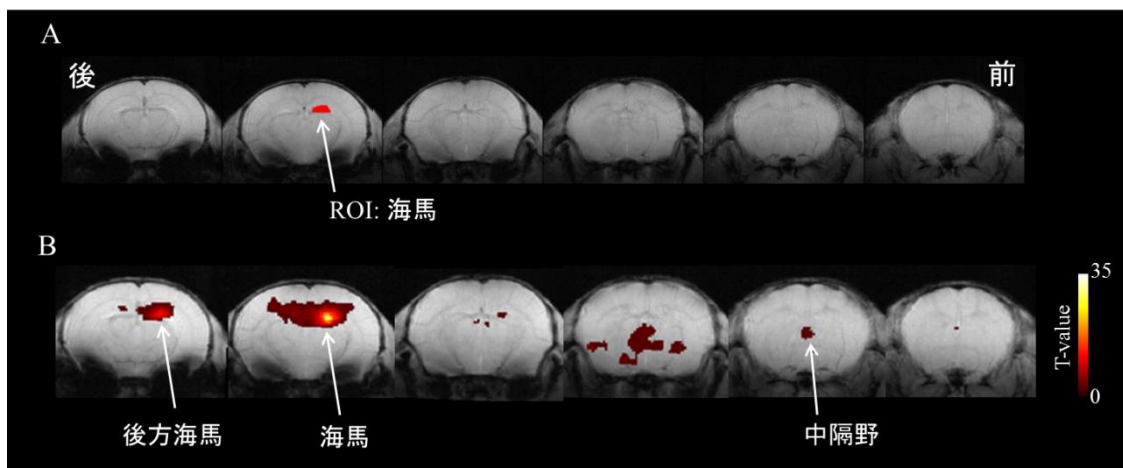


Fig. 27 構築した MRI 装置による rsfMRI の検討

(A) FLASH シークエンスによるマウスの全脳画像を示す。高信号画像を得るため、fMRI 撮像用に用いる FLASH シークエンスから、加算回数を増やして撮像を行った。(B) 右側海馬に ROI を置き (A)、FC 解析を行った結果、海馬とコネクションがある領域を示す。(n=15)。有意水準は one sample t-test により、uncorrected  $p < 0.001$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。DG とコネクションがある領域は海馬全体と中隔野の領域で検出する事が出来た。

### 3-4. 考察

傾斜磁場コイルの作製において、渦電流の抑制がとても重要である。本研究では渦電流を抑制するためにアクティブシールド法と前強調法を用いた。まず、アクティブシールドコイルがある事で、SNR が高く、アーチファクトを抑えられた MRI 画像を得られる事が分かった。この結果から、アクティブシールドコイルの必要性が示唆される。しかし、アクティブシールドコイルだけでは渦電流の完全な抑制はできず、EPI 画像に歪みのアーチファクトが生じてしまった。そこで前強調法により電流量の調節を行う事で、この歪みのアーチファクトを改善する事ができ、渦電流による影響を小さくする事に成功した。これらの結果から、fMRI 解析を行う際には、3層コイルより6層コイルの方が適しているのではないかと考えられる。よって、本研究のマウス fMRI 実験において、6層コイルを使用する事にした。

しかし、6層コイルによる EPI 画像では、マウスの脳全体の画像を得る事が出来なかった。これは RF コイルに大きな原因があるのではないかと考えている。脳全体の EPI 画像を得るためには、傾斜磁場コイルの調節だけではなく、RF コイルの調節も重要である。アーチファクトが少ない EPI 画像を得るためには磁場の均一性が大切である。本研究において、傾斜磁場コイルの均一性は渦電流の補正により確保できているが、RF コイルが形成する磁場の均一性は確保出来ていない。本研究で作製した RF コイルの均一空間は小さく、均一にプロトンを励起出来る空間が小さくなるため、脳全体の EPI 画像が得られないのではないかと考えている。一般的にサーフェース型の RF コイルにおける均一空間はループ部位の半径を直径とした球型の空間である。本研究ではループ部位の大きさは  $15 \times 17$  mm で設計したため、均一空間の直径は約 7.5 mm から 8.5mm の空間しかない。マウス脳の大きさは約 10-20 mm であるため、全脳を撮像する事は難しいと思われる。

FLASH 画像において渦電流の影響は EPI 画像より少ない事が分かった。さらに脳全体における FLASH 画像も得る事が出来た。FLASH シークエンスは EPI シークエンスより、傾斜磁場コイルのスイッチングが少ないため、渦電流や磁場の不均一性による影響が少なくなったと考えられる。これにより、アーチファクトの発生が少なくなり、FLASH 画像による脳全体の撮像が可能となったと考えられる。FLASH 画像は従来の fMRI 解析に用いられてきたが、EPI 画像より BOLD 信号の感受性が低いという欠点がある。しかし、本研究では脳全体の fMRI 解析を目的としているため、FLASH 画像を用いて fMRI 解析を行う事にした。第一章と第二章で行った fMRI 実験においても FLASH 画像を用いて解析を行った。FLASH シークエンスにおいて、RF パルスを印加してから、エコー信号を得るまでの時間を echo time (TE) と呼ぶが、この TE が長くなる程、撮像時間が長くなってしまう。第一章と第二章で用いた 4.7 tesla の MRI 装置では TE を 15 ms に設定した事で、時間分解能が 20 秒となった。しかし、14.1 tesla の MRI 装置を用いた事で、TE を短くしても fMRI 解析に十分な MRI 信号が得られたため、TE を短くする事が可能となり (TE=2.2 ms)、時間

分解能を 3 秒まで短くする事が出来た (第四章 4-2-4 を参照)。低磁場や高磁場 MRI では FLASH シークエンスの時間分解能を 3 秒にする事は難しい。時間分解能を 3 秒まで高くする事が出来たのは超高磁場 MRI 装置の利点でもある。

次に、6 層コイルを用いた FLASH 画像により、fMRI 解析が可能かどうかの検討を行った。第二章で行ったラットの rsfMRI 実験を元に、海馬 DG に ROI を置き、DG とのコネクションが得られるかどうかを検討した。その結果、海馬ネットワークを検出する事が出来た。第二章で行ったラットの rsfMRI 実験におけるコントロール群の結果 (Fig. 16A) と比べ、ROI を置いた反対側の海馬とのコネクションも検出する事が出来た。さらに、後方の海馬や中隔野の領域とのコネクションも検出する事が出来た。中隔野は海馬と密接に繋がっており、海馬と共に認知機能を担っている領域である (Kerbler et al., 2013; Roland et al., 2014)。これにより、海馬全体のコネクション解析だけでなく、海馬と他の領域とのコネクション解析が可能である事が分かった。よって、本研究で構築した MRI 装置を用いて、グローバルネットワーク解析が可能である事が示唆された。

次に、この装置の問題点について考察する。一番の問題点は脳全体における EPI 画像が撮像出来ない点である。これには RF コイルの改良が必要である事が考えられる。改善項目としてはループ部位の大きさとその形状の改善が挙げられる。ループ部位の大きさを大きくすると、均一領域が広がり、より広い領域の MRI 画像を撮像する事が可能である。しかし、ループ部位の大きさを大きくするとチューニングが取りにくいという問題が生じて来る。そこで、ループ部位の大きさとチューニングの検討が必要になってくる。また、サーフェス型の RF コイルには RF コイルに近い程信号が強く、遠くなる程信号が弱くなる問題点がある。これはループ部位の形状を検討する事で解決できるのではないかと考えている。コイルの形状をマウス脳に合う様に湾曲させる事で、均一領域の深度を深くできるのではないかと考えている。しかし、この時においても、チューニングの取りにくさという問題が生じる。今後の改善ポイントは RF コイルにおけるループ部位の大きさと形状であると考えている。

次の問題点は、RF シールドの問題である。RF シールドは傾斜磁場が形成する磁場と RF コイルが形成する磁場が干渉しないようにするシールドである。その他にも、RF シールドにより、チューニングの調節し易さが変わって来る。RF コイルと RF シールドの間には 4 cm の間隔を空けた場合において、一番 MRI の信号値が高くなるという報告がある (Ong et al., 1995)。しかし、本研究で作製したコイルには 4 cm の間隔をあける空間がないため、どうしても、RF シールドと RF コイルが密接してしまう。さらに傾斜磁場コイルの振動に伴い、RF コイルと RF シールドが接触してしまい、それがノイズの原因になってしまう事が多い。ノイズ対策として RF シールドの検討が必要である。

次に、傾斜磁場コイルのスペックの問題が挙げられる。Buruker 社の Micro5 system による傾斜磁場コイルは傾斜磁場強度が高く、また耐久度も高い。また、傾斜磁場が立ち上がるまでの時間が早く、発生した傾斜磁場の均一性も高い。本研究で作製した傾斜磁場コ

イルは **Micro5 system** の傾斜磁場コイルと比べると、傾斜磁場強度が低く、耐久度も小さい。そのため、傾斜磁場コイルが立ち上がる時間も長く、発生した傾斜磁場の均一性も低くなる。このため、**EPI** のような高速で電流のスイッチングを行うシーケンスには耐えられなかったのではないかと推測される。これにより、様々なアーチファクトが見られ、さらに、全脳における **EPI** 画像の取得も出来なかったのではないかと考えている。これを解決するためには、傾斜磁場強度とコイルの耐久度を向上させた傾斜磁場コイルを作製する必要があると思われる。

以上のことから、本研究で構築した **MRI** 装置では、一般的に **fMRI** 研究で用いられている **EPI** シーケンスを使用して **fMRI** 実験を行う事は難しいと考えられる。**RF** コイルに関する検討や傾斜磁場コイルのスペックの検討を行う事で、**EPI** シーケンスの使用も可能になるのではないかと考えている。本研究における今後のマウス **fMRI** 実験では、全脳において機能画像を取得する事が出来る **FLASH** シーケンスを用いて行う事にした。

本研究で構築した **MRI** 装置はマウスの解析しかできず、ラットを用いる事は難しい。しかし、神経科学の分野では、ラットよりマウスの方が汎用性が高い。また、遺伝子改変動物の使用を考えた時、ラットよりマウスの方が遺伝子改変動物を作り易い。このため、本研究で構築した **MRI** 装置は様々な遺伝子改変動物のネットワーク解析や神経活動の計測に応用出来ると考えられる。例えば、認知症等の脳神経疾患に関与している遺伝子や記憶形成を制御している遺伝子を改変したマウスを用いて、**fMRI** により脳内のネットワークや神経活動を計測する事で、神経疾患の原因解明や記憶形成のメカニズム解明に繋がると考えられる。

第三章の結果では、**6** 層コイルを用いる事で、超高磁場 **NMR** 磁石を用いた **MRI** 装置を構築する事が出来た。さらに、構築した **MRI** 装置を用いてマウスの全脳における **fMRI** 解析が可能である事も分かった。そこで、この装置を用いて放射線照射によるマウスの海馬ネットワーク変化を第四章で解析した。

## 第四章

### マウスを用いた放射線照射による 海馬ネットワーク変化

## 4-1. 序論

第四章は、放射線治療を受けたがん患者の臨床研究を行うため、基礎研究を目的とした。第二章では放射線照射により認知機能障害と新生ニューロン数が低下している時、海馬ネットワークに変化が起きる事が分かった。しかし、その fMRI 実験の結果では臨床研究への応用が難しいと判断した。臨床研究への応用を行うため、NMR 磁石を用いたマウス fMRI 技術の確立を第三章で行った。第四章では第三章で確立した技術を用いて、マウスにおける海馬と他の領域のネットワークを解析する事により、臨床研究への応用を目指した基礎研究を行った。

新生ニューロンの影響を高い感度で評価するため、若い週齢のマウスを用いて実験を行った。新生ニューロン数は加齢に伴い減少する事が分かっている (Bizon et al., 2003; Drapeau et al., 2003)。週齢が若いほど、新生ニューロンが多く、放射線照射による新生ニューロンの障害が顕著となると考えられる。また、臨床研究への応用を目的とするため、一般的な放射線治療に用いられている 2 Gy のフラグメント照射を行ったマウスを用いて実験を行った。

ヒトの脳内ネットワークは未知な事が多く、さらにそのネットワークは数多く存在する。そのため、着目すべきネットワークの同定は困難を極める。本研究では海馬ネットワークに着目して研究を行っているが、海馬においてもネットワークは複数存在し、その同定は難しい。そこで動物実験を用いて、新生ニューロンの影響を最大限にした時の海馬ネットワーク変化を解析することで、着目すべきネットワークの選定を行った。

さらに、rsfMRI 解析によるネットワーク解析だけではなく、構造解析も同時に行った。14.1 tesla MRI 装置の利点を生かし、高シグナル/ノイズ比で高分解能の構造画像を取得する事で、放射線照射による脳内の構造変化の解析を行った。構造解析には diffusion tensor imaging (DTI)解析と voxel-based morphometry (VBM)解析の 2 種類の方法を用いた。

### 4-1-1. DTI

DTI は水の拡散情報を MRI により画像化する方法である (Le Bihan et al., 2001; Waver et al., 2009; Yan et al., 2012)。DTI からは様々な構造的な情報を得る事が出来る。特に本研究では fractional anisotropy (FA) という指標を用いた。FA 値は、水の拡散の方向性を示す値で、FA 値が高い程、方向性が定まっている事を示す。FA 値は脳内では神経繊維の構造を反映している。例えば、白質領域では神経細胞の軸索が集まっている領域であり、水の方向性が限定されるため、FA 値が高くなる。FA 値の減少は水の方向性の低下を示し、神経学的には神経繊維の脱落、損傷、脱ミエリン化を反映している。本研究では、DTI 解析の FA 値を用いる事で、放射線照射後における海馬神経繊維の構造変化を解析した。

解析方法には fMRI 解析で用いた voxel-based analysis の手法と ROI-based analysis の

手法を用いた。FA 値を脳全体でマップ化した FA マップを用いて、海馬のどの脳領域で FA 値が変化しているのかを解析するため、**voxel-based analysis** を用いた。解析ソフトには fMRI 解析の前処理と同様に SPM を用いて、FA マップの **normalize** を行い、集団的な統計解析を行った。そして、統計解析から得られた結果を元に、その領域に着目し、ROI を用いた解析を行った。FA 解析の流れを Fig. 28A に示した。

#### 4-1-2. VBM

VBM は脳内の体積変化を解析する手法である (Chebrolu et al., 2006; Cosottini et al., 2012)。解析ソフトは SPM を用いて行う。VBM 解析において重要な事は **segment** である。**segment** は解剖画像を用いて脳領域を灰白質 (**gray matter, GM**)、白質 (**white matter, WM**)、脳髄液 (**cerebrospinal fluid, CSF**)に分ける作業である。VBM では灰白質や白質の体積を評価する事が可能である。本研究では海馬の灰白質の体積を評価した。**segment** を行うためには **segment** の **template** でもある **tissue probability map (tpm)**が必要となる。この **tpm** は脳領域において、どの領域が灰白質や白質であるのかの確率をマップ化したものである。ヒトにおける **tpm** も **normalize** の **template** と同様に世界中で使用されている **tpm** が存在するが、マウスの **tpm** は存在しない。そこでマウスの **tpm** を作製する所から始めた。

**segment** の次に重要となるのは **modulation** である。**voxel-based analysis** により MRI 画像を用いて体積変化を解析するためには、MRI 信号に体積情報を含ませなければならない。この作業が **modulation** である。例えば、体積が大きい程、信号値が高くなる事を示す。この **modulation** を行った画像を用いる事で体積変化を **voxel-based** な手法により評価する事が可能である。VBM 解析の流れを Fig. 28B に示した。



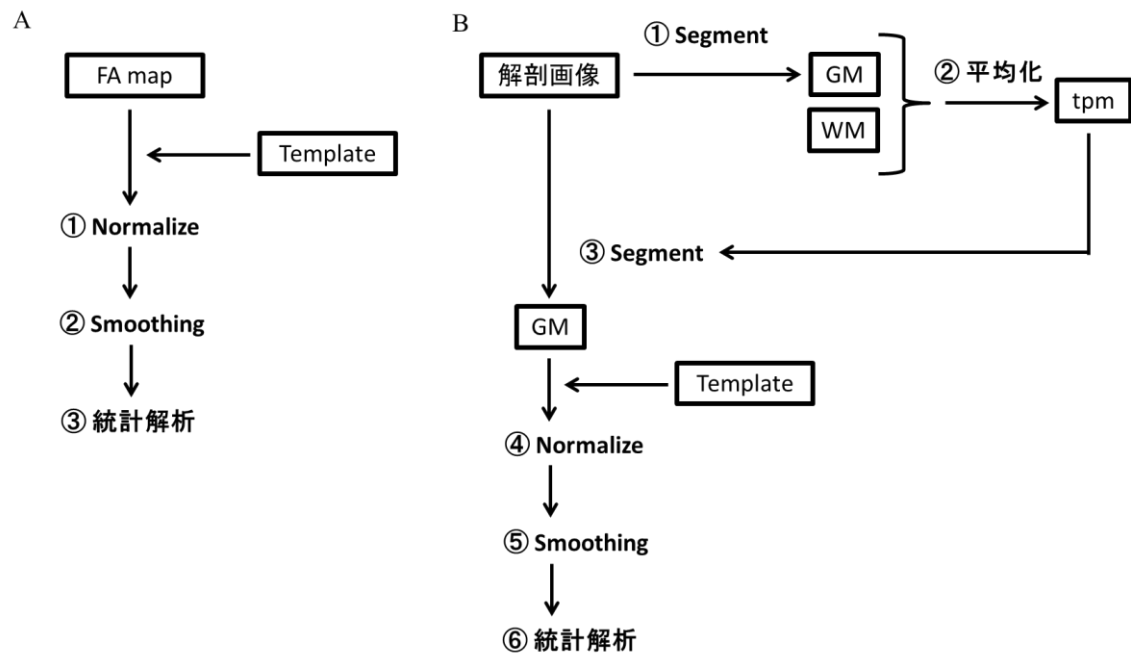


Fig. 28 DTI 解析と VBM 解析について

(A) DTI 解析についての流れを示す。FA map を FA template を用いて normalize し、smoothing を行う。その後に統計解析により、FA の変化を解析する。(B) VBM 解析の流れを示す。解剖画像を segment し、gray matter (GM) と white matter (WM) に分割する。この GM と WM を用いて、tissue probability map (tpm) を作製する。この tpm を元に解剖画像を segment し、GM と WM に分割する。そして GM だけを用いて template に normalize し、smoothing を行い、統計解析を行って、体積を比較する。

## 4-2. 方法

### 4-2-1. 動物

1 週齢のマウス (C57BL/6N)に、ケタミン(三共株式会社, Tokyo, Japan)を 100 mg/kg、キシラジン(バイエル薬品株式会社, Tokyo, Japan)を 25 mg/kg の濃度で筋肉注射により麻酔を導入した。麻酔が効いた後、マウスの頭部以外の胴体部を鉛 (2 cm 厚の鉛)で遮蔽し (Fig. 29)、ガンマ線照射機(Elan 3000 ; MDS Nordion, Ottawa, Canada)に入れた。<sup>137</sup>Cs を線源とするガンマ線を 1 日 1 回、10 Gy/min の線量で 12 秒間照射し、この操作を 5 日間行い、総量 10 Gy (2 Gy×5)を照射した。その後、マウスは麻酔から回復するまで、37°C に保温しておき、ホームケージに戻して、6 週間後に実験を行った。コントロール群はケタミンとキシラジンの麻酔のみを行い、ガンマ線照射群と同様に 37°C に温めておき、ホームケージに戻し、6 週間後に実験を行った。BrdU は放射線照射後、マウスに 100 mg/kg (生理食塩水に溶解)の濃度で 1 日おきに 3 回腹腔投与した。この 6 週間後に行動実験を行い、灌流固定を行った。

### 4-2-2. 行動実験

第二章 2-2-3 と同様に行った (P. 39 参照)。

### 4-2-3. 免疫染色

第二章 2-2-4 と同様に行った(P. 40 参照)。免疫染色に用いたマウスは行動実験を行った後のマウスを用いた。各群において、行動実験を行ったマウスの内、5 匹のマウスを用いて免疫染色を行った。

### 4-2-4. MRI 撮像

放射線照射から 6 週間後に MRI 実験を行った。始めに、rsfMRI の撮像を行い、その後、脳を取り出して、*ex vivo* で DTI と VBM 用の MRI 画像を撮像した。rsfMRI では作製した 6 層の傾斜磁場コイルと RF コイルを用いて撮像を行った。rsfMRI に用いたマウスは行動実験や免疫染色を行ったマウスとは別のマウスを用いた。

rsfMRI の実験では、マウスに  $\alpha$ -chloralose (Sigma, 0.1 M boric acid, 30 %プロピレングリコールの溶液に溶解)を 50 mg/kg の濃度で腹腔投与して、麻酔を行った状態で実験を行った。麻酔後、マウスを固定用ベッドに固定し、さらにサージカルテープで胴体を簡単に固定した。始めに、位置合わせ用のシークエンス (1-tripilot)でマウス脳全体の位置を把握

し、撮像範囲を決定した。rsfMRI は FLASH シークエンスを用いて撮像した。TR=44.12 ms, TE=2.2 ms, flip angle=17° , field of view=18 mm×18 mm, acquisition matrix=90×90, voxel size=0.2 mm×0.2 mm×0.35 mm, slice thickness=0.35 mm, slice number=8, volume number=150, time resolution=3 s, total scan time=7 min 30 s のパラメータで行った。撮像範囲は海馬を中心に設定した。次に解剖画像を 2D-TurboRARE T2 シークエンスを用いて撮像した。TR=2500 ms, TE=33 ms, field of view=18 mm×18 mm, acquisition matrix=128×128, slice thickness=0.35 mm, slice number=14, average=15, scan time=10 min のパラメータで行った。

rsfMRI 実験後、マウスは PBS と 4% PFA を用いて灌流固定を行い、その後、脳を単離した。単離した脳は 4°C で 4% PFA に 1 週間固定した。その後、DTI と VBM 用の MRI 画像を撮像した。

固定した脳は、10 mm の NMR サンプル管 (Wilma glass company, Inc., Buena, USA) に入れ、さらに Fluorinert FC-770 (Sigma-Aldrich, MO, USA) で満たした。高磁場以上の MRI 装置において、サンプル内に空気があると、サンプルと空気における磁化率の違いから空気自体もノイズの原因となってしまう。これを防ぐためにフッ素 (MRI はプロトンの信号を検出するため、フッ素は影響がない) からなる液体 (Fluorinert) でサンプル管を満たす事で、空気による影響を少なくした。DTI と VBM 用の MRI 画像を得るための傾斜磁場コイルは Micro5 システム (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) を用いて行った。始めに脳の位置を正確に得るため、FLASH を用いて axial, sagittal, coronal の 3 断面の画像を得た。この画像を見ながら、撮像角度と撮像範囲を決定した。VBM 用の画像は脳全体の撮像を行った。DTI 用の画像は海馬を中心に設定した。VBM 用の画像は 2D-TurboRARE T2 シークエンスを用いて撮像した。TR=3300 ms, TE=33 ms, field of view=12 mm×12 mm, acquisition matrix=256×256, voxel size=0.046 mm×0.046 mm×0.3 mm, slice thickness=0.3 mm, slice number=30, scan time=90 min のパラメータで行った。DTI 用の画像は spin echo-diffusion シークエンスを用いて撮像した。TR=2500 ms, TE=27 ms, field of view=12 mm×12 mm, acquisition matrix=128×128, voxel size=0.093 mm×0.093 mm×0.5 mm, slice thickness=0.5 mm, slice number=10, b value=0 and 1500 s/mm<sup>2</sup>, 12 directions, scan time=20 hours のパラメータで行った。

#### 4-2-5. rsfMRI 解析

解析ソフトには SPM を主に使用した。始めに、撮像したデータを analyze format に変換した。Bruker のオペレーションシステムにより、撮像した MRI データは一般的な MRI データである DICOM 形成で保存されるため、データ変換は一般化されている。SPM にデータ変換プログラムが組み込まれているため、SPM を用いて analyze format に変換した。

ラットの実験で用いた Varian 製の 4.7 tesla MRI 装置では Varian 社のオペレーションシステムにより、MRI 撮像を行った。これにより、MRI データの保存形式は FDR 形式となり、FDR 形式は SPM のプログラムに対応していない。そのため、第一章と第二章で行っ

た fMRI 解析では、データ変換の際に、画像データのみの変換になってしまい、画像以外の情報（撮像条件、画像の位置情報、画像のサイズ）は変換されていない。しかし、Bruker 社のオペレーションシステムでは、MRI データの保存形式が DICOM 形式となるため、DICOM 形式は SPM に対応している。そのため、画像以外の情報もデータ変換されており、位置情報の変換等の作業も簡潔に行う事が出来る。これらの理由により、第四章における rsfMRI の解析方法は、第一章や第二章の解析方法とは多少異なる部分がある。

前処理には、データ変換を行った FLASH 画像（機能画像）と Turbo RARE T2 シークエンスによって得た解剖画像を用いた。機能画像は 150 データあるが、最初の 5 データは解析に使用せず、145 データを解析に使用する。これは fMRI ではシークエンスの始めの立ち上がりによりムラがあり、信号が安定しないためである。始めに前処理を行った。機能画像は **realignment** を行い、先頭の機能画像に位置を補正する。次に、解剖画像を用いて **segment** を行った。**segment** は SPM の **extention toolbox** にある **SPMouse** を使用して行った。SPM はヒト用の解析ソフトであるため、サイズのパラメータがヒト用のサイズになっている。またマウス用の **tpm** が存在しない。**SPMouse** を用いる事で、サイズをマウス用に変更し、さらに **SPMouse** にある **tpm** を利用してマウスの **segment** を行った。**segment** により、マウスの解剖画像を GM と WM に分けた。ここでは GM、WM 画像ではなく **segment** 後の解剖画像を用いて次の解析を行った。**segment** は GM と WM に分けるだけではなく、MRI 画像の信号値の補正も行っている。静磁場、傾斜磁場、RF コイルが形成する磁場の不均一により、脳全体において均一な MRI 信号を得る事は難しく、MRI 信号値の不均一が生じてしまうため、この MRI 信号の不均一を補正している。ここではこの MRI 信号の不均一を補正した解剖画像を使用した。**realignment** 後の機能画像と **segment** 後の解剖画像を用いて **co-register** を行い、機能画像と解剖画像の位置情報を合わせた。次に、解剖画像の **normalize** を行った。**normalize** 用の標準画像 (**template**)は **segment** 後の解剖画像を用いて、**DARTEL** により全個体の平均脳画像を作製した。この **template** に **segment** 後の解剖画像を **normalize** した。この時のパラメータを用いて、機能画像を **normalize** した。**normalize** した機能画像は 0.6 mm の FWHM で **smoothing** した。

前処理を終えた機能画像は **REST** を用いて、**trend Filter** と **band Pass Filter** の処理を行った。その後、**MRICron** を用いて、ブレグマから、 $\pm 1.20$  mm ML,  $-2.20$  mm DV,  $-2.20$  mm AP の位置を中心に 4 voxel からなる海馬 DG の ROI を作製した (Fig. 31A)。この ROI を置く方法は過去の報告(Williams et al., 2010; Xie et al., 2013) を参考にした。そして、作製した ROI に対する FC map を個体ごとに解析した。

統計解析は SPM8 を用いて、**one-sample t-test** を行った。この統計解析により、個体間で共通してコネクションがある領域を算出し、それを t コントラストマップとした。この t コントラストマップを解剖画像に重ねて表示させた。

コネクションの強さ (Z-score)は MarsBar を用いて解析した。**MRICron** により、ブレグマから、 $\pm 2.30$  mm ML,  $-2.20$  mm DV,  $-2.20$  mm AP の位置を中心に 4 voxel からなる

CA3 の ROI (Fig. 31A) と、MarsBar により、one sample t-test から得られた前頭前野のクラスタを ROI として作製した。それぞれの FC 解析を行ったデータから、CA3 と前頭前野の FC 値 (Z-score) を MarsBar により抽出した。この FC 値を全個体から抽出し、各群の平均値をその群のコネクションの強さとした。

#### 4-2-6. DTI 解析

各個体の FA map は diffusion toolkit (<http://www.trackvis.org>) を用いて作製した。FA map の前処理には SPM5 と SPMouse を用いた。各 FA map は SPM5 を用いて位置合わせをマニュアルで行った。各 FA map から DARTEL を用いて平均 FA map (template) を作製した。この template を用いて各 FA map を normalize した。その後、0.3 mm の FWHM で smoothing した。

統計解析は SPM8 を用いた。two-sample t-test により、差分解析を行い、FA 値の増加・減少している領域を算出した。この時、海馬マスクを用いて、解析領域を海馬のみに限定した。差分解析による t コントラストマップは各個体の解剖画像を平均化した画像に重ねて表示させた。

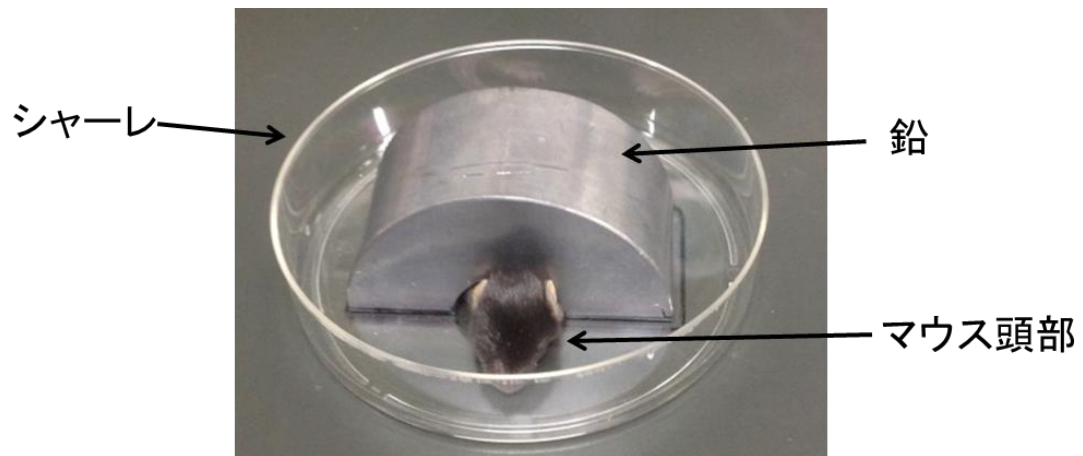
この時に得られた有意 voxel を MarsBar により ROI に変換して、その ROI 内の FA 値を各個体から抽出し、各群の平均値をその群の FA 値とした。

#### 4-2-7. VBM 解析

解剖画像は SPM5 を用いて、位置合わせをマニュアルで行った。その後、SPM5 と SPMouse を用いて 2 回 segment を行った。最初の segment は tpm を作製するために行い、2 回目の segment で GM と WM に分けた。rsfMRI で行った segment とは違い、本研究の個体にあった正確な tpm を作製する事で、精度良く体積を比較する事が出来る。一回目の segment により、各個体の解剖画像から GM と WM に分けた。各個体の GM と WM を DARTEL により、GM と WM の平均画像を作製し、その画像を tpm とした。そしてこの作製した tpm を用いて、もう一回、個体毎に segment を行い、GM と WM に分けた。この GM を用いて、DARTEL により GM の平均画像を作製し、この画像を normalize の template とした。この template を用いて normalize を行い、0.21 mm の FWHM で smoothing した。

統計解析は SPM8 を用いた。two-sample t-test により、差分解析を行い、体積が増加・減少している領域を算出した。この時、海馬マスクを用いて、解析領域を海馬のみに限定した。差分解析による t コントラストマップは作製した template に重ねて表示させた。

次に、海馬の体積を求めた。海馬全体の ROI を作製し、MarsBar を用いて segment 後の各個体から ROI 内の値を抽出する。この値に 1 voxel 当たりの体積と ROI の voxel 数を掛ける事で、ROI 内の体積を算出する事が出来る。



**Fig. 29** マウス頭部への放射線照射

1週齢のマウス頭部にガンマ線を照射した。この時、マウスの胴体部は2 cm厚の鉛（半ドーナツ型）で遮蔽した。

### 4-3. 結果

始めに、マウスにおける放射線照射による認知機能への影響を調べた。所属研究室の過去の結果から、ラットの結果と同様にマウスにおいても放射線照射 6 週間後のみにおいて、放射線照射による海馬依存的な認知機能障害と新生ニューロン数の減少が起こる事が分かっている (今岡修士論文, 2012)。この事から、マウスの実験においても、放射線照射 6 週間後に着目して実験を行った。また、臨床研究に応用するため、放射線治療で用いられている 2 Gy のフラグメント照射を用いた。さらに放射線照射に対する新生ニューロンの影響を最大限に観察するため、週齢の若いマウスを用いて実験を行った。

1 週齢のマウスの頭部にガンマ線 2 Gy を 5 回照射した。その 6 週間後にラットの実験と同様に海馬依存的な認知機能を contextual fear conditioning test (CFC test) により、新生ニューロン数を免疫染色により調べた。CFC test の結果、放射線照射により、freezing time が有意に減少している事が確認できた (Fig. 30A, B)。次に免疫染色により、神経幹細胞から分裂後 6 週間経過した新生ニューロン数を比較した結果、放射線照射により、BrdU+/NueN+細胞数が有意に減少している事が確認できた (Fig. 30E)。これらの結果から、ラットの結果と同様に、マウスでも放射線照射 6 週間後に認知機能障害と新生ニューロン数の減少が確認できた。そこで、放射線照射 6 週間後におけるマウス海馬ネットワーク変化を rsfMRI により解析した。

ラットの rsfMRI 実験の結果から、DG-CA3 間のネットワーク変化に着目して FC 解析を行った。新生ニューロンが存在する左右の DG に ROI を置き、その ROI に対するコネクションがある領域を求めた (Fig. 31A, B)。DG-CA3 間のコネクションの強さを解析した結果、両側海馬において、放射線照射により DG-CA3 間のコネクションの強さが減少していた (Fig. 31C, D)。この結果から、ラットの rsfMRI 実験の再現性が確認できた。

さらに、DG と前頭前野 (prefrontal cortex, PFC) のネットワークにも変化がある事が分かった (Fig. 32)。両側海馬の DG に ROI を置き、FC 解析を行った結果、前頭前野の内側部 (medial PFC, mPFC) の領域において、放射線照射により、DG とコネクションを示す領域が前頭前野で減少していた (Fig. 32A, B)。さらに、DG と中隔野のネットワークにも変化がある事が分かった (Fig. 33)。両側海馬の DG に ROI を置き、FC 解析を行った結果、中隔野の領域において、放射線照射により DG とコネクションを示す領域が減少していた (Fig. 33A, B)。

次に、放射線照射による海馬内の構造変化を解析した。DTI 解析の FA 値を解析する事で、海馬における神経線維の構造変化を評価した。FA 値を voxel-based analysis の手法を用いて解析し、FA 値がどの領域で変化しているのかを評価した。この解析では、海馬内の構造変化を調べるため、海馬マスクを用いて、解析領域を海馬に限定した。その結果、海馬 DG において放射線照射により、FA 値が減少している事が分かった (Fig. 34A)。Fig. 34A で得られた、有意に FA 値が減少している領域から FA 値を抽出した。この FA 値を解析した結

果、DGにおいて放射線照射により、FA値が有意に減少していた (Fig. 34B)。さらに、このDGにおけるFA値の変化はDG-CA3間の接続の強さと正の相関がある事が分かった (Fig. 34C)。また、DGにおけるFA値の変化はDG-前頭前野間の接続の強さと正の相関がある事も分かった (Fig. 34D)。

最後に、海馬内の体積変化を解析するため、VBM解析を行った。VBM解析においても、DTI解析と同様に、海馬マスクを用いて、海馬内の体積変化を解析した。その結果、海馬の体積が減少している事が分かった (Fig. 35A)。実際の海馬全体の体積を求めた結果、海馬全体の体積は放射線照射により、有意に減少している事が分かった (Fig. 35B)。さらに、この海馬体積変化はDG-CA3間の接続の強さと正の相関がある事が分かった (Fig. 35C)。また、海馬体積変化はDG-前頭前野間の接続の強さと正に相関する傾向がある事も分かった (Fig. 35D)。



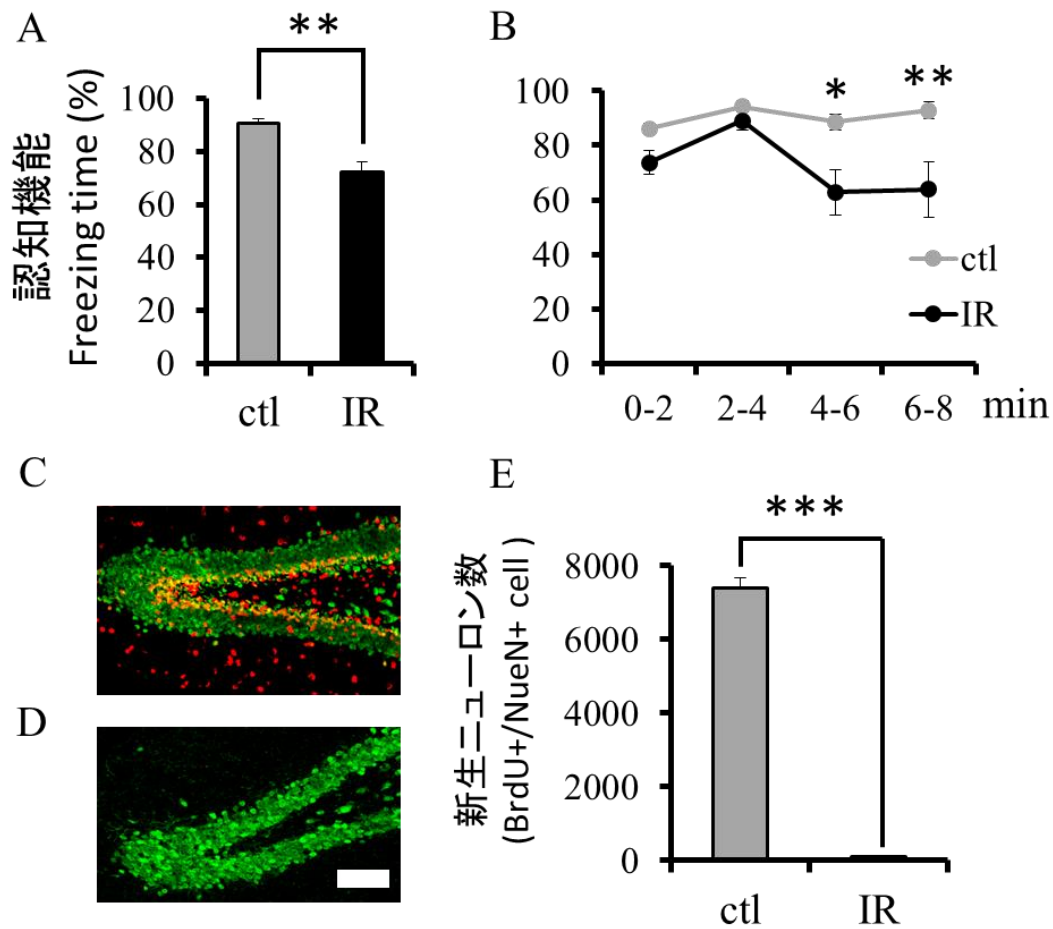


Fig. 30 マウスにおける放射線照射 6 週間後の認知機能変化と新生ニューロン数の変化 (A, B) CFC test の結果を示す (各群、n=8)。 (A)は freezing time の合計を示し、 (B)は 2 分毎の freezing time を示す。放射線照射により、freezing time が減少した。 (A)は student's t-test (\*\*p<0.01)を行い、 (B)は two way repeated ANOVA と post hoc Scheffe's test (IR 群 vs ctl 群, \*p<0.05, \*\*p<0.01)を行った。 (C, D)は免疫染色の代表画像を示す。 (C)が非照射マウス、 (D)が照射マウスの画像を示す。赤: BrdU、緑: NueN、scale bar: 10 $\mu$ m。 (E) 新生ニューロンの数 (BrdU+/NueN+細胞)を比較した(各群、n=5)。放射線照射により新生ニューロンの数が減少した。 \*\*\*p<0.001 (student's t test)

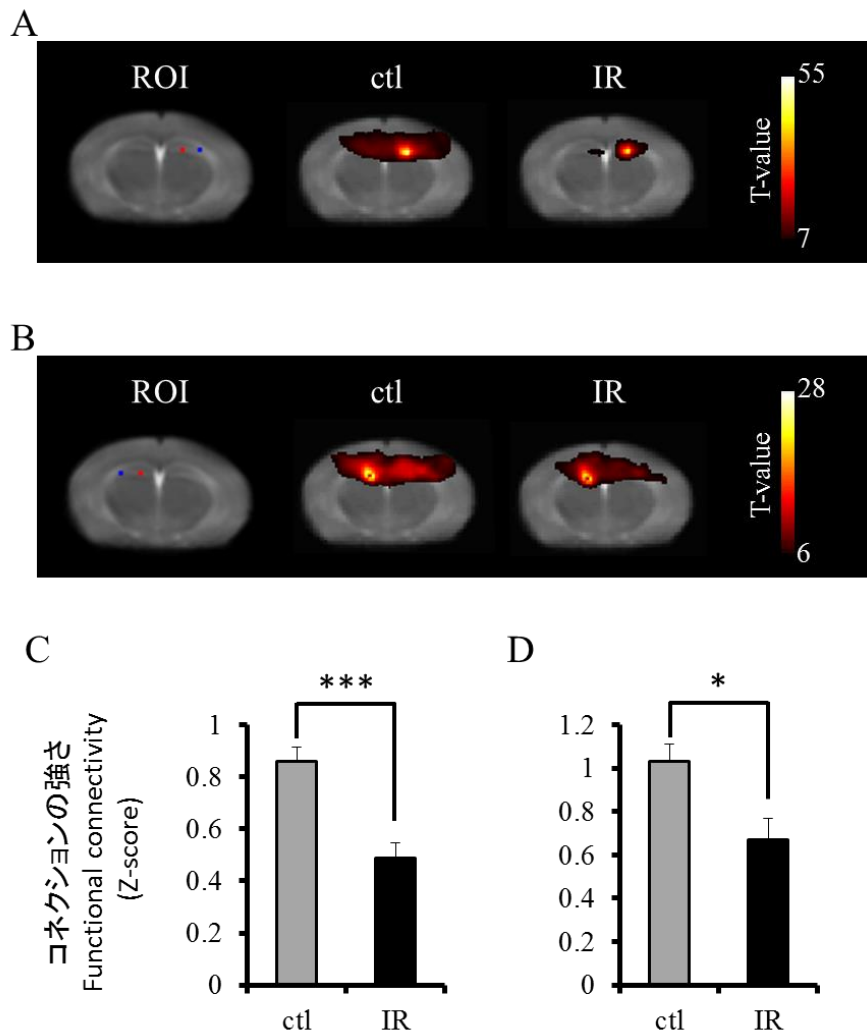


Fig. 31 マウス rsfMRI 解析による放射線照射 6 週間後における DG と CA3 のネットワーク変化

(A, B) 海馬 DG (赤い ROI) に ROI を置き、その ROI に対するコネクションがある領域を示した。(A) は右 DG に ROI を置いた時、(B) は左 DG に ROI を置いた時のコネクションを示す(各群、n=11)。有意水準は one sample t-test により、(A) では corrected  $p < 0.001$  のレベル、(B) では corrected  $p < 0.01$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。マウス脳はブレグマから -2.2 mm の距離にありスライスを示す。(C, D) DG (赤い ROI) と CA3 (青い ROI) とのコネクションの強さを示す。(C) は右側のコネクションの強さを、(D) は左側のコネクションの強さを示す。放射線照射により、DG-CA3 間のコネクションの強さが減少した。\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (student's t test)

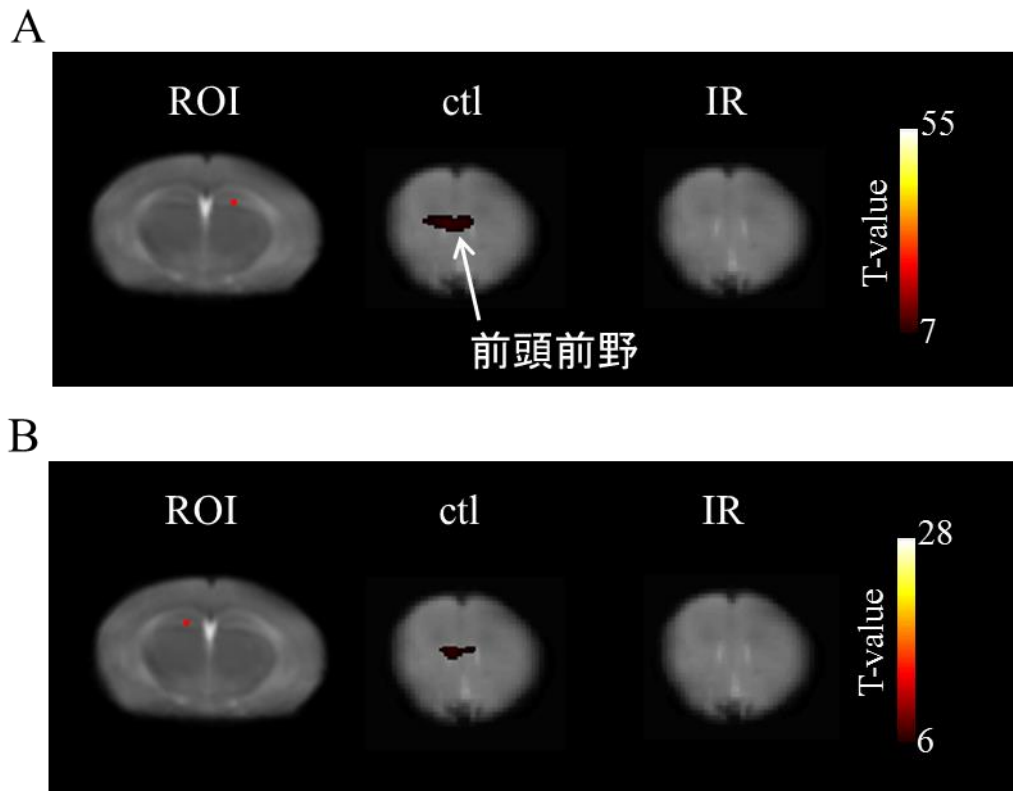
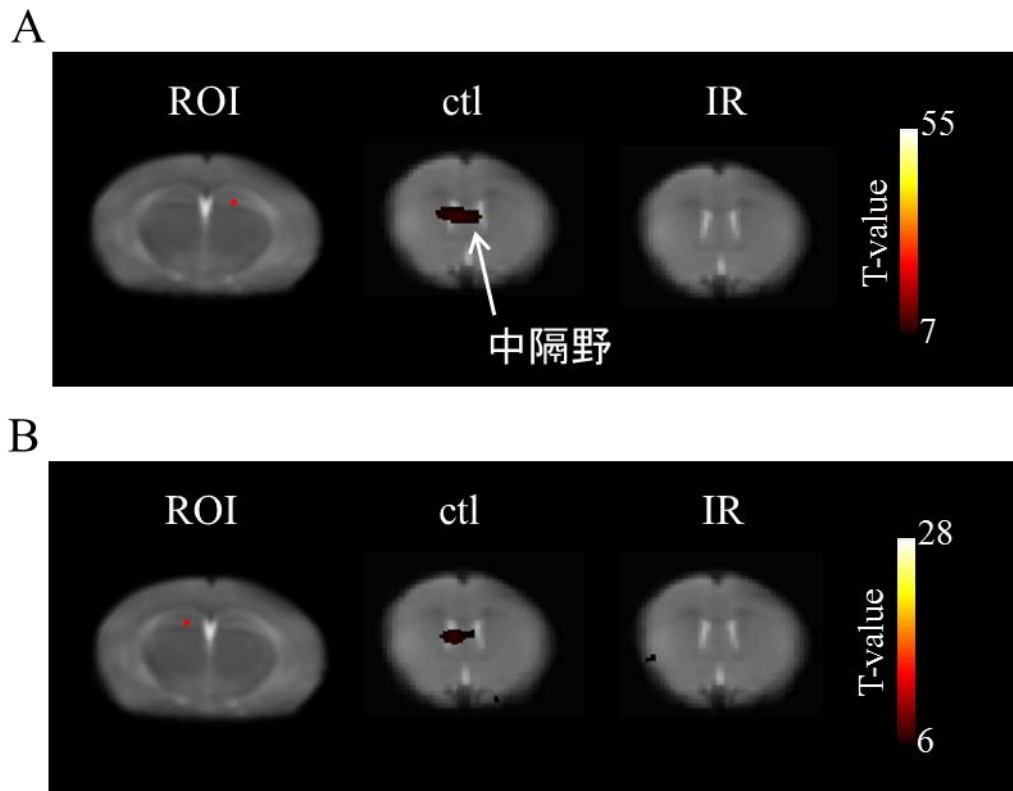


Fig. 32 マウス rsfMRI 解析による放射線照射 6 週間後における DG と前頭前野のネットワーク変化

海馬 DG (赤い ROI) に ROI を置き、その ROI に対するコネクションがある前頭前野の領域を示した(各群、n=11)。(A)は右 DG に ROI を置いた時、(B)は左 DG に ROI を置いた時の前頭前野におけるコネクションを示す。有意水準は one sample t-test により、(A)では corrected  $p < 0.001$  のレベル、(B)では corrected  $p < 0.01$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。DG に ROI をおいたスライスがブレグマから -2.2 mm の距離にありスライスを、前頭前野のあるスライスはブレグマから +1.4 mm の距離にありスライスを示す。放射線照射により、DG-前頭前野間のコネクションが減少した。



**Fig. 33** マウス rsfMRI 解析による放射線照射 6 週間後における DG と中隔野のネットワーク変化

海馬 DG (赤い ROI) に ROI を置き、その ROI に対するコネクションがある中隔野の領域を示した(各群、n=11)。(A)は右 DG に ROI を置いた時、(B)は左 DG に ROI を置いた時の中隔野におけるコネクションを示す。有意水準は one sample t-test により、(A)では corrected  $p < 0.001$  のレベル、(B)では corrected  $p < 0.01$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。DG に ROI をおいたスライスがブレグマから  $-2.2$  mm の距離にありスライスを、中隔野のあるスライスはブレグマから  $+0.6$  mm の距離にありスライスを示す。放射線照射により、DG-中隔野間のコネクションが減少した。

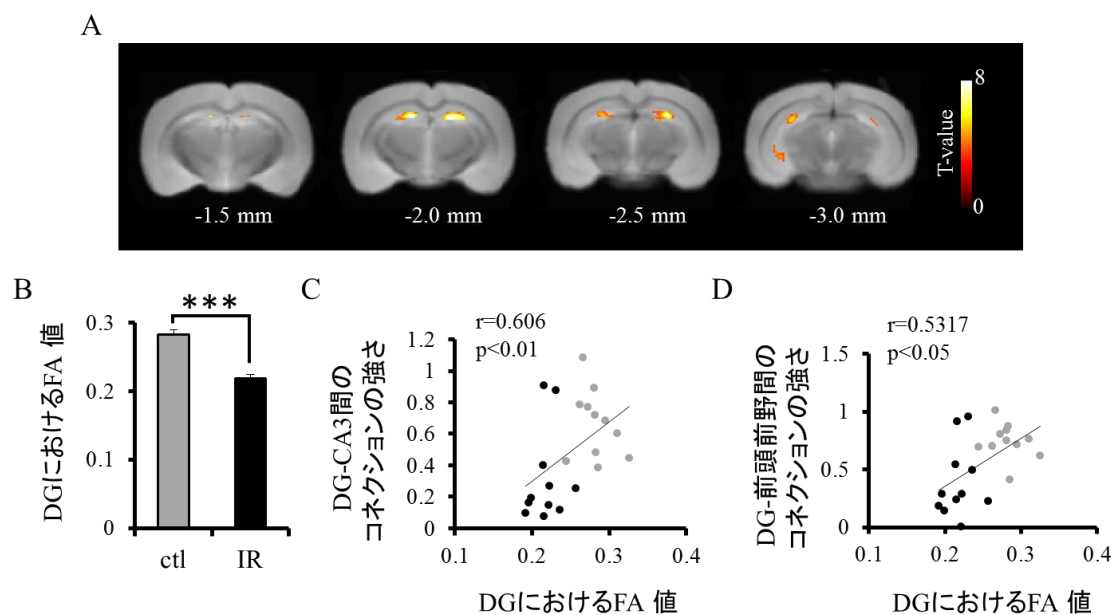


Fig. 34 DTI 解析における放射線照射による海馬の構造変化

(A) FA 値が放射線照射により減少している領域を示す(各群、n=11)。有意水準は two sample t-test により、uncorrected  $p < 0.001$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。パネル下方に示した数字はブレグマからの距離を示す。(B) 右側海馬において、Fig. A で得られた FA 値が減少している領域における FA 値を抽出した。(C) 右側海馬において、DG における FA 値と DG-CA3 におけるコネクシオンの強さの相関を示す。(D, G) 右側海馬において、DG における FA 値と DG-前頭前野におけるコネクシオンの強さの相関を示す。灰色の丸点はコントロール群 (ctl) を、黒色の丸点は放射線照射群 (IR) を表す。DG における FA 値の変化と海馬ネットワークには正の相関関係にある事が分かる。\*\*\* $p < 0.001$  (student's t test)。

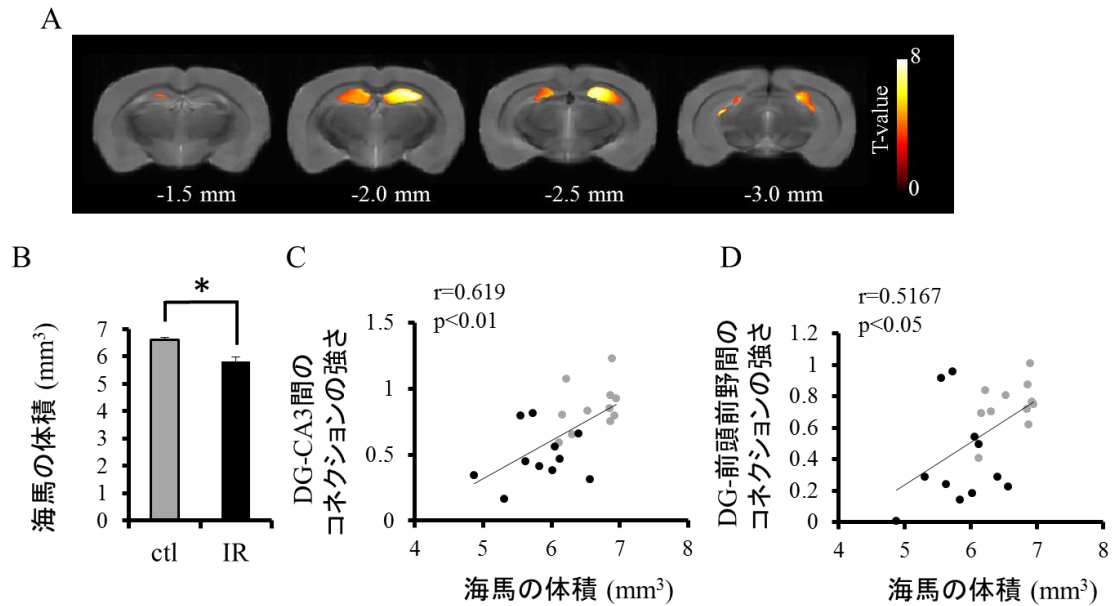


Fig. 35 DTI 解析における放射線照射による海馬の体積変化

(A) 体積が放射線照射により減少している領域を示す(各群、n=11)。有意水準は two sample t-test により、uncorrected  $p < 0.001$  のレベルで示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。パネル下方に示した数字はブレグマからの距離を示す。(B) 右側海馬における体積の比較を示す。(C) 右側海馬において、海馬の体積と DG-CA3 におけるコネクションの強さの相関を示す。(D) 右側海馬において、海馬の体積と DG-前頭前野におけるコネクションの強さの相関を示す。灰色の丸点はコントロール群 (ctl) を、黒色の丸点は放射線照射群 (IR) を表す。\* $p < 0.05$  (student's t test)

#### 4-4. 考察

第四章では、マウスを用いて実験を行った。ラットの結果と同様に放射線照射 6 週間後に着目して海馬ネットワーク変化を解析した。さらに、放射線照射による新生ニューロンへの影響を感度高く検出するため、若い週齢のマウスを使用して実験を行った。また、臨床研究への応用を考えて、2 Gy のフラグメント照射による影響を解析した。

マウスにおける rsfMRI 解析の結果、頭部への放射線照射により認知機能障害と新生ニューロン数の減少が起きている時、海馬のローカルネットワークとして DG-CA3 間のネットワーク変化と、海馬のグローバルネットワークとして海馬-前頭前野のネットワーク変化、海馬-中隔野のネットワーク変化がある事が分かった。rsfMRI を用いて、放射線照射により、海馬ネットワークに変化が起こる事を発見した事は新規性が高い。

DG-CA3 間のネットワーク変化が見られた事は、第二章で行ったラットの実験と同様な実験結果である。これにより、DG-CA3 間のネットワークに変化が起きる事をマウスの実験でも再現する事が出来た。また、この結果は第三章で開発した MRI 装置を用いて fMRI 研究が出来る事を示している。DG-CA3 間におけるネットワーク変化に関する考察は第二章で述べた。マウスでも同様の事が生じていると考えられる。

ここでは構造解析の結果を踏まえて、第二章の考察をさらに深めていく。第四章の実験から、DTI 解析により、海馬 DG において FA 値が減少する事が分かった。この DG における FA 値の減少は新生ニューロンの減少を反映していると考えられる。他の研究グループから、FA 値の減少は神経線維の損失または障害である事が示されている (Chan et al., 2009; Wang et al., 2009; Wang et al., 2013)。また、放射線照射後では海馬の FA 値が減少する事も既に報告されている (Trivedi et al., 2012; Kumar et al., 2013)。DG のニューロンは CA3 領域に苔状線維 (mossy fiber) と呼ばれている軸索を伸ばしている。つまり、放射線照射により DG の FA 値が減少した事は、新生ニューロン数が減った事により、新生ニューロンの軸索または樹状突起が減少した事を示唆しているのではないかと考えられる。また、本研究では DG における FA 値の変化と DG-CA3 間のコネクシオンの強さには正の相関関係にある事も分かった。これらの事から、放射線照射による新生ニューロンの減少により、DG-CA3 間のネットワーク変化が引き起こされたのではないかと考えられる。さらに、海馬体積についても、放射線照射により海馬の体積が減少し、また DG-CA3 間のコネクシオンの強さと海馬の体積は正の相関関係にある事が分かった。他の研究グループでは放射線照射により、海馬の体積が減少する事が既に報告されている (Gazdzinski et al., 2012)。また、運動により新生ニューロン数を増加させた時、海馬の体積は増加する事も報告されている (Biedermann et al., 2012; Fuss et al., 2014)。これらの報告から、新生ニューロンと海馬の体積には関連性があるのではないかと考えられる。以上の事から、放射線照射による新生ニューロンの低下により、DG-CA3 間のコネクシオンが低下した可能性が高いのではないかと考えられる。

次に、前頭前野 (PFC) について考察する。前頭前野は海馬と密接に関与している領域である。前頭前野は海馬采 (fimbria) と脳弓 (fornix) と呼ばれている神経線維の束を通り、海馬と連絡している事が知られている。特に、海馬 CA1 領域と前頭前野が密接に連絡している (Cenquizaca et al., 2007; Godsil et al., 2013)。また、前頭前野は海馬と共に、認知機能にも関与している重要な領域でもある (Milad et al., 2002)。マウスでは特に前頭前野内側部 (mPFC) が記憶形成に重要な領域であると考えられている (Beeman et al., 2013)。

本研究の結果から、DG と前頭前野のネットワークに変化がある事が分かった。このネットワーク変化においても新生ニューロンが関与している可能性が高いと考えられる。DG における FA 値の変化と DG と前頭前野のコネクションの強さに正の相関がある事から、新生ニューロンの減少と DG と前頭前野のネットワーク変化に関連性がある事が示唆される。また、海馬から前頭前野への投射は、CA1 の軸索が海馬采と脳弓を通過して、前頭前野に投射される (Cenquizaca et al., 2007)。DG から前頭前野への直接の投射はなく、DG から前頭前野へ信号を伝達するためには CA3 を通り、さらに、CA1 を介さなければならない。つまり、DG から前頭前野へ信号を伝達するためには、新生ニューロンを介している事が考えられる。これらの事から、海馬と前頭前野のネットワーク変化にも新生ニューロンが関与しているのではないかと考えられる。海馬-前頭前野ネットワークにおける新生ニューロンの関与の報告がある (Rapanelli et al., 2011)。

次に、中隔野について考察する。中隔野も前頭前野と同様に海馬と密接に関与している領域である。中隔野のニューロンは海馬采と脳弓を通り、海馬全体に投射している事が知られている (Kerbler et al., 2013)。そして、DG に投射している中隔野のニューロンは新生ニューロンへの分化を調節している事が報告されている (Kaneko et al., 2006; Itou et al., 2010)。さらに中隔野は海馬と連携して認知機能にも大きく関与している領域である事も知られている (Roland et al., 2014)。中隔野から海馬に投射しているニューロンはアセチルコリンによる神経活動の制御を行っており、この制御によって認知機能に関与しているシータリズムの発生を制御している (Cornwell et al., 2008)。これらの事から、中隔野は海馬における認知機能や新生ニューロンの分化と大きく関わっている重要な領域である事が分かる。本研究の結果から、DG と中隔野のネットワークに変化がある事が分かった。このネットワーク変化においても新生ニューロンが関与している可能性が高いと考えられる。中隔野から DG に投射しているニューロンはアセチルコリンを神経伝達物質として、新生ニューロンに対して入力を行い、新生ニューロンへの分化を制御している (Kaneko et al., 2006; Itou et al., 2010)。この事から、中隔野のニューロンは新生ニューロンに対しても入力を行っており、新生ニューロンの減少によって、中隔野から DG への投射が減少するのではないかと考えられる。また、海馬から中隔野への投射は CA3 と CA1 の軸索が海馬采と脳弓を通過して、中隔野に投射される。海馬-前頭前野のネットワークと同様に、DG から中隔野への直接の投射はなく、DG から中隔野へ信号を伝達するためには CA3 や CA1 を介さなければならない。つまり、DG から中隔野へ信号の伝達は新生ニューロンを介している事が



考えられる。これらの事から、海馬と中隔野のネットワーク変化にも新生ニューロンが関与している可能性が高いのではないかと考えられる。

今までの研究報告では放射線照射による脳内の構造変化についての報告はあった (Biedermann et al., 2012; Gazdzinski et al., 2012; Fuss et al., 2014)。しかし、放射線照射による脳内のネットワーク変化を rsfMRI により解析した報告は今まで無かった。放射線照射による DG のニューロンに関する神経機能の変化に関する報告はあった。放射線照射により、海馬依存的な認知機能に障害が起こる事 (Saxe et al., 2006; Kitamura et al., 2009; Raber et al., 2011; Greene-Schloesser et al., 2012)、認知機能に関与している DG の long-term potentiation (LTP) が変化する事 (Kitamura et al., 2009)、神経活動により発現が高まる Arc 遺伝子の発現量が変化する事 (Burghardt et al., 2012)、そして DG における発火パターンが変化する事 (Lacefield et al., 2012) が報告されている。本研究の実験結果から、DG の神経機能だけではなく、DG とのローカルネットワークや、さらに海馬とのグローバルネットワークの変化を発見する事ができた。さらに、放射線照射による影響として海馬の構造変化と機能変化には関連性がある事も発見する事ができた。

放射線照射により海馬のグローバルネットワークが変化するという発見は fMRI を用いる事で発見に繋がったと考えられる。神経機能の解析や脳内ネットワークの解析において、パッチクランプ法や脳波計測のような電気生理学的な手法や免疫染色やカルシウムイメージング法のようなイメージングによる解析手法では、侵襲性が高く、またグローバルネットワーク解析が出来ないという欠点がある。本研究ではこうした欠点がない fMRI を取り入れる事で、新しい発見に繋げる事が出来た。また、超高磁場 MRI 装置を用いる事で、空間分解能や時間分解能を高くする事ができるようになった事は大きな利点である。

ここで、放射線の脳への影響として、新生ニューロン数の減少以外の事を考察する。放射線照射による脳内の影響として、白質の損傷が挙げられる (Wang et al., 2009 and 2013; Xiong et al., 2013)。放射線照射により、ミエリンやオリゴデンドロサイトに影響を与え、神経軸索の髄鞘が低下してしまう (Panagiotakos et al., 2007)。これにより、神経伝達に影響が見え、認知機能にも影響が出る事が推測される。次に脳内の炎症が挙げられる。放射線照射による脳内のダメージにより、アストロサイトやミクログリア等のグリア細胞が活性化し、炎症反応が見られる事が分かっている (Chan et al., 2009)。また、炎症反応は認知機能にも影響を与える事が知られている (Glass et al., 2010; Chin et al., 2013)。次に放射線照射による血管障害が挙げられる。脳内の血管にも、分裂細胞である造血幹細胞が存在し、この分裂細胞が放射線に影響を受けやすい事から、血管においても障害が起こる事が示唆されている (Monje et al., 2002; Panagiotakos et al., 2007)。また、放射線照射によりネクローシスが起こる事から、分裂細胞だけではなく、他の細胞にも影響を与える事が示唆される。本研究においても、これらの影響が起こっていると考えられる。しかし、放射線照射による認知機能障害を考えた時、本研究の結果から、放射線照射 1 週間後においては、認知機能に影響は見られなかった。白質損傷、炎症反応、ネクローシス、血管障害

は放射線照射 1 週間後においても見られる。さらに急性期だけではなく、慢性期（放射線照射から 4 ヶ月後）においても認知機能は見られず、認知機能障害は放射線照射 6 週間後においてのみ観察された。新生ニューロンは分裂後、4-6 週間で海馬ネットワークに組み込まれ、認知機能に影響を与える事から (Zhao et al., 2006; Ge et al., 2007; Toni et al., 2008; Denny et al., 2012)、本研究で得られた放射線照射 6 週間後における海馬ネットワーク変化は、新生ニューロンの減少が原因である可能性が高いと考えられる。

放射線照射による海馬ネットワーク変化の原因が海馬新生ニューロンの減少である事を証明するためには、新生ニューロンを特異的に阻害する、または活性化させた動物を用いて同様な実験を行う事が考えられる。新生ニューロンを特異的に除去出来るトランスジェニックマウスは数多く存在しており、GFAP-TK マウス (Denny et al., 2012)、Nestin-TK マウス (Deng et al., 2009) など様々なトランスジェニックマウスの開発が進んでいる。また、自発的な運動により、新生ニューロンの数が増加する事が知られているため (van Praag et al., 1999)、自発運動をさせたマウスを用いる事も考えられる。これらの動物を用いて、新生ニューロンを阻害させた時と、活性化させたさせた時に、本研究で発見した海馬ネットワークにおいて、コネクシオンの増加、減少を確認する事が出来れば、放射線照射による海馬ネットワーク変化の原因が海馬新生ニューロンである事を証明する事ができるのではないかと考えている。

以上のように、第一章から第四章までの実験結果から、放射線照射により、海馬ネットワークが変化する事が分かった。特に、DG-CA3 のネットワーク、海馬-前頭前野のネットワーク、海馬-中隔野に変化が起こる事が分かった。ここで、動物実験の結果を臨床研究へ応用する事について考える。一般的にヒトの fMRI 解析では分解能が低く、DG や CA3 の様な海馬内の領域を区別する事は難しい。また、ヒトにおける中隔野の領域は小さく、ROI を作製する事が難しい。しかし、前頭前野の領域は区別する事が可能である。そこで、放射線治療を行ったがん患者を用いて臨床研究を行うにあたり、海馬-前頭前野のネットワークに着目して、放射線治療後の海馬ネットワーク変化について解析する事にした。

## 第五章

# NPC 患者を用いた放射線照射に関する 海馬ネットワーク変化

## 5-1. 序論

第四章で行ったマウス rsfMRI 実験の結果から、放射線照射後では海馬内 (DG-CA3) のネットワーク変化と海馬外 (海馬-前頭前野、海馬-中隔野) のネットワーク変化が起きている事が分かった。この結果を用いて、第五章では臨床研究を行った。ヒトの脳内ネットワーク解析では着目すべきネットワークを特定する事は難しいが、動物実験から得られた情報を元に、ヒトの研究において着目すべきネットワークを特定する事が出来た。

第五章では、放射線治療を受けたがん患者を用いて、放射線治療後の海馬ネットワーク変化を解析する事を目的とした。一般的にヒトの MRI 装置では 1.5 tesla または 3 tesla の装置を用いるため、fMRI 解析では分解能を高くする事は難しく、DG や CA3 のような領域を区別する事は難しい。また、中隔野も小さいため、領域を特定する事が難しい。そのため、ヒトにおいて DG-CA3 や海馬-中隔野のネットワーク解析は難しいと考えられる。そこで、海馬-前頭前野のネットワーク変化に着目して、ネットワーク解析を行った。本研究では上咽頭がん (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 患者を用いて臨床研究を行った。本研究は、台湾の高雄医科大学との共同研究として行った。

### 5-1-1. NPC 患者と放射線治療

NPC は東南アジアや南アジアに多いがんであり、日本では比較的希な疾患である。この NPC の原因として地域特有の食物やタバコ、Epstein-Barr (EB) ウイルスが原因ではないかと考えられているが (Chen et al., 2011)、はっきりとは分かっていない。この NPC は男性に多い事が知られており、男女比は約 3:1 である。また低年齢層 (20-30 歳) でも見られる事も知られている (Chen et al., 2011)。上咽頭は喉の奥の方に位置し、NPC の進行に伴い、発生機能障害、嚥下機能障害、顔面障害が見られる事が報告されている (Hsu et al., 1983; Gouliamos et al., 1996; Hyare et al., 2010)。

NPC が発生する領域を Fig. 36 に示した。上咽頭にがんができる事から、外科的な手術が難しく、治療方法は放射線治療が選択される事が多い (Chen et al., 2011)。放射線治療方法として、定位放射線照射とフラグメント照射の混合方法が用いられている。本研究では 2 つの照射方法の混合装置であるトモセラピーによる放射線治療を行った。この治療法は CT スキャンにより、脳の正確な位置情報を把握し、その位置情報から照射領域を決定し、出来るだけ正常な組織は傷つけないように照射する方法である。この照射方法により、一般的な放射線治療後に見られるネクローシスや白質損傷を抑える事が可能となった。しかし、本研究でリクルートした NPC 患者の治療法において、放射線照射領域に海馬前方が含まれている事から、認知機能障害が見られる事がある。放射線治療を受けた NPC 患者に関する報告でも、放射線治療後に認知機能障害が起こる事が報告されている (Cheung et al., 2003; Tang et al., 2012)。

放射線治療において、副作用を軽減させる、または副作用を回復させる事が極めて重要であり、その実現に関する研究が注目を浴びている。一般的に、他の国と比べ日本では放射線治療は避けられる傾向が高い。しかし、台湾では放射線治療を推進する傾向がある。手術や抗がん剤治療にかかる患者の負担を考えた時、放射線治療の副作用を軽減、または回復させる事ができれば、放射線治療の患者にかかる負担は小さくなり、治療をより効果的に行う事が出来るのではないかと考えられている。また、放射線治療を受けた患者の予後の改善にも貢献が出来ると考えている。

第二章におけるラットを用いた動物実験の結果から、頭部への放射線照射によって引き起こされた認知機能障害は一過性の障害であり、放射線照射 4 ヶ月後には回復する事が示唆された。また、マウスを用いた実験においても、同様な結果が得られている。この結果から、放射線治療の副作用である認知機能障害も回復する事が期待される。また、第四章の結果から、放射線照射により認知機能障害が見られる時、海馬ネットワークが減少する事が示唆された。また、この海馬ネットワーク変化には新生ニューロンが影響している可能性も示唆されている。この事から、放射線治療後の NPC 患者においても、海馬ネットワークに変化が起きる事が予想される。加えて、その変化には新生ニューロンが関与している事が予想される。この研究により、放射線治療における副作用の改善に貢献できるのではないかと考えられる。さらに、ヒトにおける新生ニューロンの研究が難しい事から、新生ニューロン研究の新たな突破口になるのではないかと期待している。

第五章では、放射線治療後に認知機能障害が見られる NPC 患者を用いて、放射線治療後の海馬ネットワーク変化を rsfMRI により解析した。さらに、放射線治療後の構造変化を DTI により解析した。rsfMRI と DTI は放射線治療を行う前 (pre)、放射線治療終了から 1 ヶ月後 (1mo)、放射線治療終了から 4 ヶ月後 (4mo) に 3 回行った。放射線治療における照射線量は 2 Gy を 35 回照射した。NPC 患者のリクルート、放射線治療、MRI の撮像は共同研究者である高雄医科大学 Sharon Chia-Ju Cen 先生、Chin-Jen Huang 先生が行った。本学位論文の著者は rsfMRI 解析と DTI 解析を担当した。さらに共同研究者は rsfMRI 撮像と合わせて、NPC 患者における認知機能試験を行い、放射線治療における認知機能障害を調べた。その結果、放射線治療 1 ヶ月後では認知機能に障害が見られる傾向にあり、4 ヶ月後では回復する傾向にある事が共同研究者から報告されている。

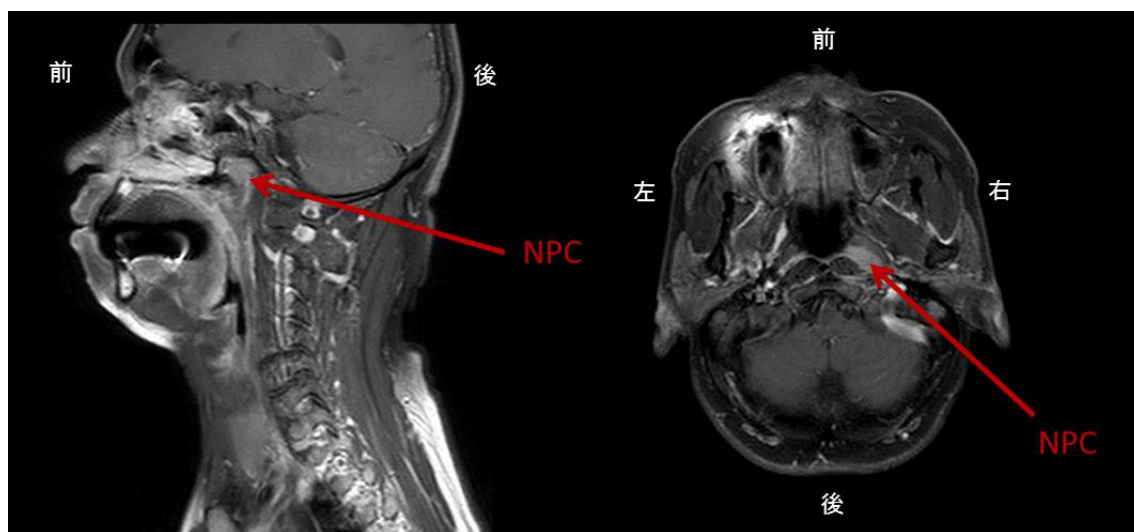


Fig. 36 NPC 患者の MRI 画像

NPC 患者における放射線治療前の MRI 画像 (T1 画像)を示す。左側の画像は sagittal 画像を、右側は axial 画像を示す。赤矢印で示した領域 (白い塊)が NPC が存在する領域である。この MRI 画像は高雄医科大学からの提供。

## 5-2. 方法

### 5-2-1. NPC 患者のリクルート

NPC 患者は2012年5月から2013年6月の期間に高雄医科大学で16名リクルートした。患者の平均年齢は  $47.6 \pm 3.0$  歳であり、男女比は男性10人、女性6名である。本研究における NPC 患者の選定基準として、組織検査による NPC の有無を確認した患者、うつ病やその他の精神病患者ではない患者、転移がない患者、以前に放射線治療を行った事がない患者をリクルートした。また、がんの進行度と広がりを示すステージ分類ではステージ1から4までの患者が含まれる。

この実験は高雄医科大学での倫理委員会への承諾を得て行った (clinical trial number: KUMH-IRB-20120255)。また、参加した患者には、実験に関する十分な説明と同意を得て行った。

患者への放射線治療は共同研究者が行い、Helical tomotherapy (HT; Accuray Incorporated, Sunnyvale, CA)を用いて治療をした。患者の首から頭にかけて固定用のマスクを装着し、患者の頭を固定した。CTにより、頭全体の構造画像 (厚さ3 mm)を取得し、頭と NPC の位置情報を得た。次に、Pinnacle workstation を用いて、放射線照射を行う領域を決定した。NPC 領域を含む gross tumor volume (GTV)は10 mm 以内、clinical target volume (CTV)は GTV から5 mm までの領域とした。この CTV の領域には NPC 領域以外にも、上咽頭全体、頭蓋骨基底部分、リンパ節が含まれる。planning target volume (PTV)は CTV から3 mm までとした。1日2 Gy を照射し、35日間行った (総線量は70 Gy)。放射線治療は1週間に5回行い、7週間かけて行った。患者の情報は Table 4 に示した。海馬全体における総線量の平均は  $6.7 \pm 0.7$  Gy である。本研究でリクルートした患者において、ステージ2以上の患者は放射線治療と薬剤治療を並行して行った。薬剤治療には、多くのがん治療で用いられている cisplatin を使用した。薬剤投与と放射線治療は同時に行った。

### 5-2-2. MRI 撮像

MRI 撮像は、放射線治療を行う前 (pre)、放射線治療を終えてから1ヶ月後 (1mo)、放射線治療を終えてから4ヶ月後 (4mo)の3回行った。最初の撮像から2回目の撮像の間は平均で  $34.5 \pm 2.6$  日、2回目の撮像から3回目の撮像の間は平均で  $128.8 \pm 4.3$  日である。撮像には3.0 tesla MRI 装置 (Signa HDx, GE, Milwaukee, WI, USA)を用いた。

撮像中、患者にはヘッドギアによる頭部の固定を行い、またヘッドフォンを装着してもらった。患者には「目は閉じたまま、出来るだけ何も考えないようにする。また寝ないようにする」を伝えた。

rsfMRI 撮像は EPI シークエンスを用いて行った。TR=2000 ms, TE=35 ms, Flip angle=80° ,

Field of view=220 mm×220 mm, Acquisition matrix=64×64, Slice thickness=4 mm, Gap=0 mm, Slice number=28, Volume number=180 のパラメータで行った。その後、解剖画像の撮像は 3D T1-weighted magnetization-prepared rapid gradient echo (MPRAGE)シークエンスを用いて行った。TR=2.5 ms, TE=4.38 ms, Flip angle=8° , Field of view=240 mm×240 mm, acquisition matrix=256×256, Slice thickness=0.5 mm, gap=0.5 mm, slice number=248 のパラメータで行った。DTI の撮像は EPI-diffusion シークエンスを用いて行った。TR=9300 ms, TE=91.6 ms, Flip angle=90° , Field of view=220 mm×220 mm, Acquisition matrix=128×128, Slice thickness=3 mm, Gap=0 mm, Slice number=38, b value=0 and 1000 s/mm<sup>2</sup>, 30 directions のパラメータで行った。

### 5-2-3. rsfMRI 解析

解析には SPM8 を主に使用した。始めに、撮像したデータを SPM8 により analyze format に変換した。前処理にはデータ変換を行った rsMRI 画像 (機能画像)と解剖画像を用いる。機能画像は 180 データあるが、最初の 5 データは解析に使用せず、175 データを解析に使用する。これは信号が不安定であるためであり、また MRI から出る騒音に患者が慣れる時間をおくためである。機能画像は realignment を行い、先頭の機能画像に位置を補正する。次に、解剖画像を用いて segment を行った。realignment 後の機能画像と segment 後の解剖画像を用いて co-register を行い、機能画像と解剖画像の位置情報を合わせた。次に、解剖画像の normalize を行った。normalize 用の標準画像 (template)は SPM に組み込まれている MNI template を用いた。この template に segment 後の解剖画像を normalize した。この時のパラメータを用いて、機能画像を normalize した。normalize した機能画像は 6 mm の FWHM で smoothing した。

前処理を終えた機能画像は REST を用いて、trend filter と band pass filter の処理をした。そして、FC 解析を行った。MarsBar を用いて、前方海馬の ROI を作製し、この ROI に対する FC map を個体ごとに解析した。両側における前方海馬の ROI は Brown らの論文を参考にし、中心座標を  $x=\pm 24$  mm、 $y=-13$  mm、 $z=-20$  mm (MNI 座標系)とした半径 3 mm の球型の ROI を作製した (Brown et al., 2012)。PCC (posterior cingulate cortex) の ROI は Andrews-Hanna らの論文を参考にし、中心座標を  $x=-1$  mm、 $y=-50$  mm、 $z=-26$  mm (MNI 座標系)とした半径 8 mm の球型の ROI を作製した (Andrews-Hanna et al., 2007)。

SPM8 を用いて統計解析を行った。one-sample t-test と paired t-test により、個体間で共通してコネクションがある領域、個体間で変化がある領域を算出し、それを t コントラストマップとした。この t コントラストマップを解剖画像に重ねて表示させた。

コネクションの強さ (Z-score)は MarsBar を用いて解析した。paired t-test により、個体間で差があった領域を、MarsBar を用いて、ROI に変換した。その ROI を用いて、それぞれの FC 解析を行ったデータからその ROI 内の FC の値 (Z-score)を MarsBaar により抽出



した。この FC 値を全個体から抽出し、各群の平均値をその群のコネクションの強さとした。また、DMN における ROI は Andrews-Hanna らの論文を参考にして作製した (Andrews-Hanna et al., 2007)。mPFC (medial prefrontal cortex) は中心座標を  $x=-1$  mm、 $y=-50$  mm、 $z=-26$  mm (MNI 座標系) とし、右の IPL (inferior parietal lobule) は中心座標を  $x=45$  mm、 $y=-65$  mm、 $z=26$  mm (MNI 座標系) とし、左の IPL は中心座標を  $x=-45$  mm、 $y=-67$  mm、 $z=26$  mm (MNI 座標系) とし、半径 8 mm の球型の ROI を作製した。

#### 5-2-4. DTI 解析

本研究でリクルートした 16 名の NPC 患者の内、4 名分の DTI データを得る事が出来なかったため、DTI 解析は 12 名の NPC 患者で行った。各患者の FA map は DTIstudio (Jiang et al., 2006) を用いて作製した。FA map の前処理には SPM8 を用いた。各 FA map は SPM8 上で、位置合わせをマニュアルで行った。各 FA map から DARTEL を用いて平均 FA map (template) を作製した。さらに、この作製した template の座標は DARTEL を用いて MNI 座標に合わせた。この template を用いて各 FA map を normalize した。その後、6 mm の FWHM で smoothing した。

統計解析は SPM8 を用いた。paired t-test により、差分解析を行い、FA 値の増加・減少している領域を算出した。この時、白質マスクを用いて、解析領域を白質のみに限定した。差分解析による t コントラストマップは各個体の解剖画像を平均化した画像に重ねて表示させた。

この時に得られた有意 voxel を MarsBar により ROI に変換して、その ROI 内の FA 値を各個体から抽出し、各群の平均値をその群の FA 値とした。

Table 4 NPC 患者における年齢、性別、海馬への平均総線量

Patient Number	Sex	Age	D <sub>hippo</sub>	Chemo
E0427	F	42	2.00	○
E4473	M	49	8.47	×
E6180	M	62	4.91	×
L1703	M	32	5.52	○
R6962	M	36	4.58	○
R7771	F	55	3.34	○
S0973	F	28	7.32	○
S1349	F	49	6.60	○
S2663	F	45	7.07	×
S4486	M	57	3.42	○
S5460	M	64	5.80	○
S6447	F	32	8.21	○
S7246	M	56	11.86	○
S7301	M	51	11.13	○
T0019	M	39	7.84	○
T1464	M	66	10.54	×

16名のNPC患者における情報を示す。D<sub>hippo</sub>は海馬全体に照射された平均の総線量 (Gy)を示す。Chemoは薬剤治療の実施の有無を示す。

### 5-3. 結果

NPC 患者における放射線治療後の海馬ネットワーク変化を rsfMRI により解析した。rsfMRI は放射線治療前 (pre)、治療から 1 ヶ月後 (1mo)、そして治療から 4 ヶ月後 (4mo) に行った。本研究でリクルートした NPC 患者では、放射線照射範囲に海馬前方が含まれる事から (Fig. 37)、海馬前方のネットワークに着目して解析を行った。

海馬前方に ROI を置き (Fig. 38A)、その ROI に対してコネクションがある領域を求めた (Fig. 38B-D)。海馬前方とコネクションがある領域の大きさは、pre に比べ、1mo で小さくなった (Fig. 38B, C)。4mo では 1mo に比べ、海馬前方とコネクションがある領域は大きくなった (Fig. 38C, D)。特に、前頭前野外側部 (dorsolateral prefrontal cortex, dlPFC) と前頭前野内側部 (medial prefrontal cortex, mPFC) の領域において、海馬前方とコネクションがある領域は pre に比べ 1mo では小さくなり、4mo では回復している事が分かった (Fig. 38B-D)。dlPFC は前頭前野の一部であり、前頭前野の側面に位置する領域である。

動物実験の結果から、放射線照射により海馬ネットワークが減少する事が分かっている。そこで、放射線治療前後において、海馬前方とのコネクションの強さが減少するのかを解析した。voxel-base analysis を用いて、pre と 1mo における海馬前方とのコネクションの強さを比較した結果、dlPFC において海馬前方とのコネクションが減少している事が分かった (Fig. 39A)。しかし、mPFC の領域では有意な変化を検出する事が出来なかった。さらに、左側の海馬前方に ROI を置き、同様な解析を行った結果、左海馬前方とのコネクションの強さが減少している領域は無かった。また、両側海馬前方と前頭前野のコネクションの強さが増加している領域も無かった。右側海馬前方に ROI を置き、コネクションの強さが減少していた dlPFC の領域において、海馬前方と dlPFC のコネクションの強さの変化を経時的に解析した結果、pre に比べ 1mo では有意にコネクションの強さが減少していた (Fig. 39B)。さらに、1mo に比べ 4mo では、有意ではないが、増加する傾向にあった (Fig. 39B)。これらの結果より、海馬前方とコネクションがある領域では、mPFC と dlPFC において変化がある事が分かった。しかし、海馬前方とのコネクションの強さを比較した時、mPFC と海馬前方には差はなく、dlPFC において海馬前方とのコネクションの強さが減少している事が分かった。

次に、海馬ネットワークだけでなく、認知機能に関与している他のネットワークについて解析を行った。Default mode network (DMN) は認知機能に関与している事が報告されている (Andrews-Hanna et al., 2007)。DMN には主に 3 つの領域から成っている。Posterior cingulate cortex (PCC, 後部帯状回)、mPFC、inferior parietal lobule (IPL, 下頭頂小葉) の 3 領域である (Fig. 40A)。最近の研究では、加齢に伴う認知機能障害やアルツハイマー病等の認知症では DMN が減少する事が報告されている (Andrews-Hanna et al., 2007; Hahn et al., 2013; Balachander et al., 2014)。そこで、本研究においても認知機能に関与している DMN の変化を解析し、放射線治療による影響があるかどうかを調べた。

PCC の領域に ROI を置き、PCC とのコネクションがある領域を解析した (Fig. 40A)。その結果、PCC とコネクションがある領域は放射線治療により変化していない事が分かった (Fig. 40A)。さらに、PCC とのコネクションの強さを解析した結果、mPFC と左右の IPL とのコネクションの強さは放射線治療により変化が無い事が分かった (Fig. 40B-D)。この結果から、放射線治療は DMN に影響しない事が示唆された。

次に、NPC 患者における構造変化を解析するため、DTI の FA 値を解析した。その結果、FA 値に大きな変化は無かった。

これらの結果から、NPC 患者において、放射線治療後にはマウスの結果と同様に、海馬-前頭前野のネットワークが減少する事が示唆された。さらに、その変化は放射線治療 4 ヶ月後には、回復する可能性がある事が分かった。また、放射線治療による構造変化は起こらない事が示唆された。

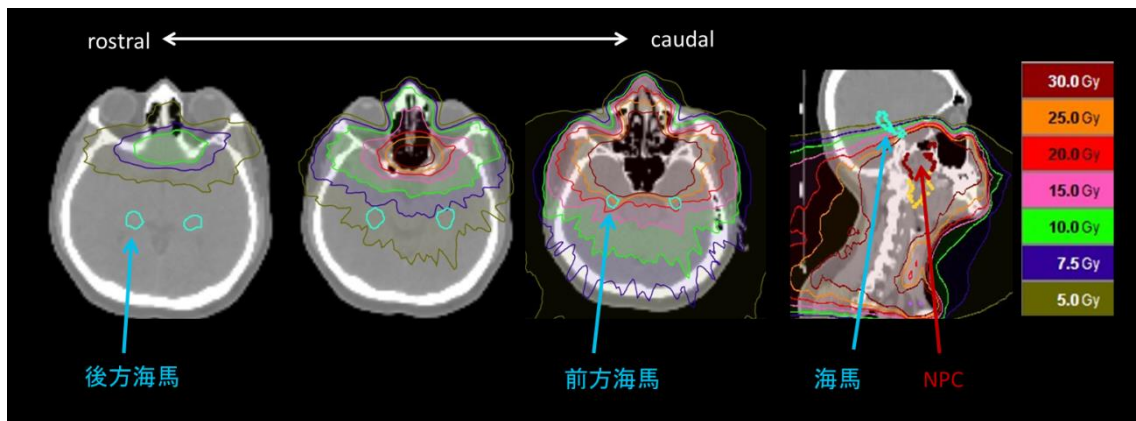


Fig. 37 NPC 患者における放射線照射の線量マップ

一人の NPC 患者における放射線治療時の総線量マップを示す。頭の図は CT スキャンによる画像である。各線量大きさを色分けしてマップ化した。左の 3 画像は axial 断面を、右の 1 断面は sagittal 断面を示す。axial 断面では、左の画像ほど頭頂側 (rostral) になり、右の画像ほど尻側 (caudal) になる。水色の領域が海馬にあたる。放射線は海馬前方に照射されているのが分かる。

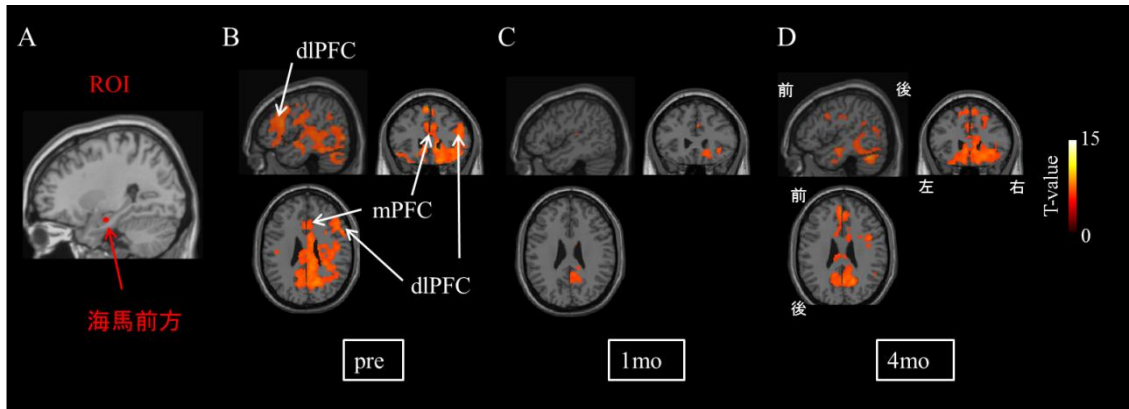


Fig. 38 NPC 患者による rsfMRI 解析における放射線治療後の海馬ネットワーク変化  
 右側海馬前方 (赤い領域) に ROI を置いた時 (A)、その ROI に対するコネクションがある領域を示した (B-D)。(B)は放射線治療前 (pre)、(C)は治療 1 ヶ月後 (1mo)、(D)は治療 4 ヶ月後 (4mo)における海馬前方とコネクションがある領域を示す。有意水準は one sample t-test により、corrected  $p < 0.05$  のレベル (voxel サイズは 100 voxels 以上)で示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。ROI を置いた断面は  $x=24$  mm (MNI 座標系)のスライス断面を示す。(B-C)のスライス断面は  $x=49$  mm、 $y=26$  mm、 $z=26$  mm (MNI 座標系)の座標における断面を使用した。海馬前方とのコネクションがある領域は放射線治療 1 ヶ月では小さくなり、4 ヶ月後ではその領域が回復した事が分かる。dIPFC: dorsolateral prefrontal cortex (前頭前野外側部)、mPFC: medial prefrontal cortex (前頭前野内側部)。

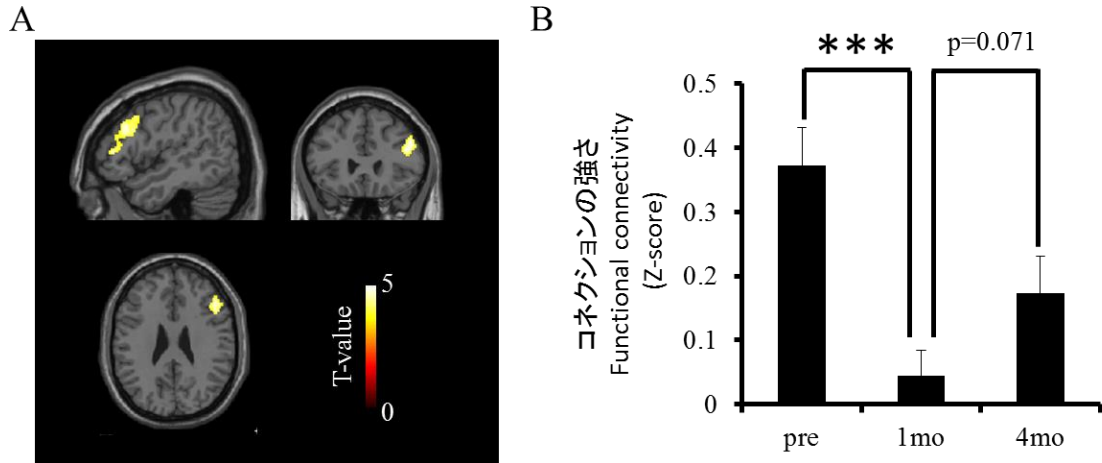


Fig. 39 放射線治療後の海馬と前頭前野におけるネットワーク変化

(A) 右側海馬前方に ROI を置き、FC 解析を行った時、pre に比べ、1mo で海馬前方とのコネクションの強さが減少している領域を示す。有意水準は paired t-test により、uncorrected  $p < 0.001$  のレベル (voxel サイズは 400 voxels 以上) で示した。カラーバーは SPM の t 値を示す。スライス断面は  $x=49$  mm、 $y=26$  mm、 $z=26$  mm (MNI 座標系) の座標における断面を使用した。前頭前野外側部(dorsolateral prefrontal cortex, dlPFC) の領域において、コネクションの強さが減少した事が分かった。(B)右側海馬前方と前頭前野外側部 (dlPFC)におけるコネクションの強さを示す。pre に比べ 1mo で減少している事が分かる。\*\*\*  $p < 0.001$  (paired t-test)

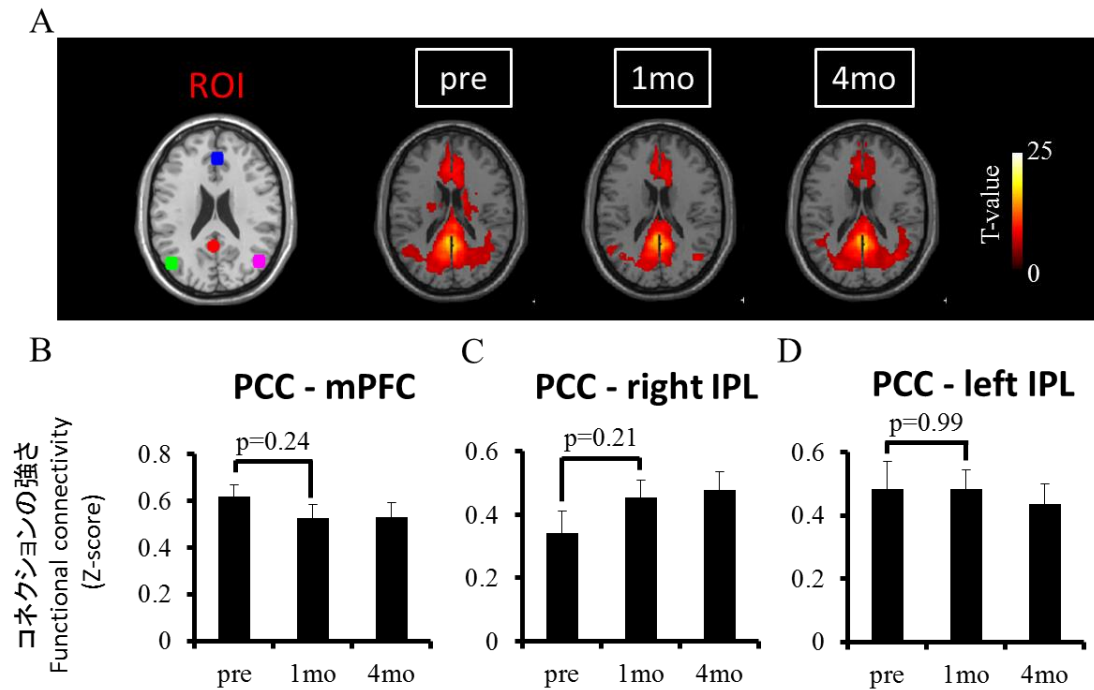


Fig. 40 放射線治療後の default mode network (DMN)の変化

(A) PCCにROIを置き、FC解析を行った時、そのROIに対するコネクションがある領域を示した。有意水準は one sample t-test により、corrected  $p < 0.001$  のレベル (voxel サイズは 100 voxels 以上)で示した。カラーバーはSPMのt値を示す。スライス断面は  $z=19$  mm (MNI座標系)の座標における断面を使用した。赤: PCC (posterior cingulate cortex, 後部帯状回)、青: mPFC (medial prefrontal cortex, 前頭前野内側部)、緑: 左側 IPL (inferior parietal lobule, 下頭頂小葉)、紫: 右側 IPL。(B) PCCとmPFCにおけるコネクションの強さを示す。(C) PCCと右側IPLとのコネクションの強さを示す。(D) PCCと左側IPLとのコネクションの強さを示す。統計解析は paired t-test を行った。放射線治療によるDMNの変化はない事が分かった。



#### 5-4. 考察

第一章から第四章の動物実験の結果を元に、海馬-前頭前野のネットワークに着目して臨床研究を行った。第五章では放射線治療を受けた NPC 患者をリクルートして、放射線治療後の海馬ネットワーク変化を rsfMRI により解析した。その結果、放射線治療後に海馬-前頭前野のネットワークが減少する事が分かった。この結果はマウス rsfMRI の結果と同様な結果となった。

ヒトにおける前頭前野はマウスに比べ、とても発達しており、大きい領域である。前頭前野 (prefrontal cortex, PFC) は大きく分けると、前頭前野内側部 (medial PFC, mPFC)、前頭前野外側部 (lateral PFC, lPFC)、眼窩前頭前野 (orbito PFC, oPFC)、前部帯状皮質 (anterior cingulate cortex, ACC) の 4 つに分ける事が出来る。mPFC、lPFC、ACC は認知機能に関与している領域であり、oPFC は感情に関与する領域である (Godsil et al., 2013)。第四章のマウスの実験では、放射線照射により mPFC 領域で海馬とのコネクション変化が見られた。第五章の NPC 患者による実験では、放射線治療により mPFC の領域だけではなく、lPFC 領域にある dlPFC 領域においても、海馬とのコネクション変化が見られた。マウスにおける海馬-前頭前野ネットワークにおいて、認知機能に関して、海馬と mPFC はとても重要な領域である事が分かっている (Milad et al., 2002)。また、前頭前野が発達しているサルやヒトにおいては、mPFC だけではなく、lPFC も認知機能に重要である事が分かっている (Bailey et al., 2011; Goveas et al., 2011)。この事から、脳機能の面から考えると、mPFC と lPFC は同様な領域であると考えられる。

NPC 患者における海馬ネットワーク変化では左右海馬において、違う結果となった。一般的にヒトの脳には左右差があると考えられている。脳の体積は左右で異なっている事が知られている。海馬においても、左右の海馬の体積が異なっている事から、左右における海馬の機能が異なっている事が示唆されている (Kronmuller et al., 2009)。また、海馬における FC 解析を行った報告においても、左右非対称な結果となっている (Zhou et al., 2008; Cao et al., 2012)。左右非対称な結果となった原因として、脳の左右差だけではなく、NPC 患者の個人差も関係しているのではないかと考えている。各 NPC 患者において、NPC が発生する領域には個人差がある。そのため、左右非対称に放射線が照射される患者もあり、各患者における放射線照射領域の影響も大きいのではないかと考えられる。これらの理由により、本研究では左右非対称な結果になったと考えられる。また、マウス脳においては、左右差がないと考えられており、さらに、全脳照射を用いたため左右均等に放射線が照射されているため、左右対称な結果になったと考えられる。

認知機能に関与するネットワークにおいて、海馬以外のネットワークでは default mode network (DMN) が存在する。本研究の結果から、この DMN は放射線治療の影響を受けない事が示唆された。加齢に伴う認知機能障害やアルツハイマー病等の認知症では認知機能障害に伴い DMN が減少する事が報告されている (Andrews-Hanna et al., 2007; Hahn et al.,

2013; Balachander et al., 2014)。本研究の結果では、この DMN は放射線治療の影響を受けない事が示唆された。この結果は、放射線治療による認知機能障害は海馬ネットワーク変化が原因である可能性を示唆している。さらに、放射線治療による海馬ネットワーク変化は新生ニューロンの影響を受けている可能性も示唆していると考えられる。

NPC 患者における MRI 研究はあまり多くはない。しかし、VBM や DTI を用いた構造的な MRI 解析を行った報告はある。例えば、放射線治療後では GM の体積が減少する事が分かっている (Lv et al., 2014)。また、他の研究グループでは放射線治療により、放射線の照射範囲にあたる側頭葉ではネクローシスが起る事が報告されており、このネクローシスの減少を DTI 解析を用いて、FA 値の減少として捉えている (Wang et al., 2012; Xiong et al., 2013)。fMRI のような機能的な MRI 研究は行われていないが、MRS を用いて神経活動に関与している代謝物の変化を捉えている (Xiong et al., 2013)。この論文では神経活動のマーカーである N-acetylaspartic acid (NAA) を MRS により測定し、放射線治療後にネクローシスが起っている側頭葉における NAA の減少を報告している。しかし、fMRI を用いて NPC 患者において放射線治療後のネットワーク変化を解析した報告はなく、本研究で行った放射線治療後の NPC 患者における fMRI 研究は世界で初めてである。

動物実験の結果から、海馬-前頭前野におけるネットワーク変化の原因が放射線治療による新生ニューロンの低下が原因ではないかと推測出来る。しかし、倫理的な問題があるため、ヒトの研究において、この仮説を証明する事は難しい。これは新生ニューロンの研究を行う手法として、侵襲的な手法しか確立されていないためである。そのため、様々な検討がなされている。他の研究グループでは、このヒトにおける新生ニューロンの研究を MRI を用いた非侵襲的な手法を用いて検討を行っている。Manganas らは脳内の代謝物を測定できる MR spectroscopy (MRS) を用いて、神経幹細胞や神経前駆細胞特異的な代謝物を同定し、その代謝物を測定する事で新生ニューロン数を評価している (Manganas et al., 2007)。Pereira らは運動時における海馬の血流を測定する事で、新生ニューロンと血流増加の観点から新生ニューロンを評価している (Pereira et al., 2007)。この 2 つの研究は新生ニューロンに関する実験は動物実験を用いて行い、その実験結果をヒトの研究に応用する事で研究を進めている。本研究においても、新生ニューロンと海馬ネットワーク変化 (海馬における BOLD 信号の同調率の変化) の関連性を動物実験により見出し、その結果をヒトの研究に応用した。ヒトにおける新生ニューロンの研究は動物実験による結果を用いて推測する事しか出来ない。そのため、新生ニューロンに関するバイオマーカーの発見が不可欠となる。上述した 2 つの研究では、そのバイオマーカーを代謝物と血流変化としている。本研究の結果から、そのバイオマーカーとして、海馬ネットワーク変化を用いる事ができるのではないかと考えている。

第五章で得られた結果から、放射線治療後 1 ヶ月後では海馬と前頭前野のネットワークが減少している事が分かった。さらに、放射線治療 4 ヶ月後にはそのネットワーク変化が回復する傾向にある事が分かった。動物実験の結果から、放射線照射による認知機能障害

は放射線照射 4 ヶ月後には回復している事が分かった。さらに、共同研究者の実験から、NPC 患者においても、放射線治療後 4 ヶ月後には放射線治療による認知機能障害が回復する傾向が示唆されている。これらの事から、放射線治療による認知機能障害は一過性の障害であり、時間経過に伴い回復する可能性が示唆された。さらに、放射線治療による海馬ネットワーク変化においても一過性の変化であり、時間経過に伴い回復する事が見込まれる。

これらの事から、放射線照射による認知機能障害には次の様な事が起こっているのではないかと考察した。放射線照射により、新生ニューロンが減少する。この新生ニューロンの減少により、海馬内と海馬外のネットワークが変化し、これにより、認知機能障害が誘導されるのではないかと考えている。

この仮説から考えた場合、放射線照射による新生ニューロンの低下を抑制、または回復させる事が出来れば、海馬ネットワーク変化を抑制する事ができ、放射線照射による認知機能障害を緩和、または回復させる事が出来るのではないかと考えられる。または、その回復を早める事が出来るのではないかと考えられる。そのため、本研究で得られた結果は、放射線治療における副作用の改善に対して、大きな意義があるのではないかと期待している。

## 結論

本研究では、頭部への放射線照射によって引き起こされる認知機能障害に対して、海馬ネットワークがどのように変化するかを調べる事を目的として研究を行った。まず、第一章では、海馬神経活動の計測技術として、ラット海馬における Opto-fMRI 技術の確立を行った。そして、第二章では、ラット頭部に放射線を照射した時、海馬神経活動と海馬ネットワークがどのように変化するかを Opto-fMRI と rsfMRI により調べた。その結果、放射線照射により認知機能障害と海馬新生ニューロン数の減少が起きている時、海馬 DG と CA3 のコネクションの強さと海馬神経活動が低下する事が分かった。しかし、第二章の実験結果からでは、海馬のグローバルネットワーク解析が出来ず、臨床研究への応用が難しいと判断した。そこで、第三章ではマウス海馬におけるグローバルネットワーク解析を行うために、超高磁場 NMR 磁石を用いた MRI 装置によるマウス fMRI 解析の開発を行った。そして、第四章では、第三章で開発した装置により、臨床研究への応用を目的として、フラグメント照射による放射線照射を行ったマウスを用いて、海馬ネットワークがどのように変化するかを解析した。その結果、海馬内のネットワーク (DG-CA3 のネットワーク) と海馬外のネットワーク (海馬と前頭前野のネットワーク、海馬と中隔野のネットワーク) が減少する事が分かった。さらに、この海馬ネットワーク変化は海馬の構造変化と大きな関係性を持っており、この海馬ネットワーク変化には新生ニューロンが関与しているのではないかという事が示唆された。このマウスで得られた結果を用いて、第五章では放射線治療を受けたがん患者 (NPC 患者) の海馬ネットワーク変化を調べた。その結果、マウスの結果と同様に、海馬-前頭前野のネットワークが減少する事が分かった。これらの本研究の結果から、頭部への放射線照射により、海馬ネットワークが減少する事が示唆された。

頭部への放射線照射による認知機能障害や海馬ネットワーク変化は一過性の障害である事が本研究の結果から示唆された。また、放射線照射により引き起こされた認知機能障害や海馬ネットワーク変化の原因は、海馬における新生ニューロンの低下である可能性が高いと考えられる。他の研究グループにおいても、放射線照射による認知機能障害は海馬新生ニューロン数の低下が原因ではないかと述べている (Rola et al., 2004; Saxe et al., 2006; Deng et al., 2009; Kitamura et al., 2009)。この事から、放射線照射後、新生ニューロン数の減少を防ぎ、回復させる事が出来れば、海馬ネットワーク変化の回復が期待でき、放射線照射による認知機能障害を改善できるのではないかと考えられる。この事から、本研究で得られた結果は放射線治療による副作用の改善に貢献できるのではないかと考えられる。

放射線照射による脳内影響として、白質損傷、炎症、血管障害等も挙げられるが (Tsui et al., 2001; Panagiotakos et al., 2007; Chan et al., 2009; Wang et al., 2009)、本研究で得られた結果は動物実験の結果から、新生ニューロンが主たる原因の一つである可能性が高いと考えられる。また、NPC 患者における放射線治療による海馬ネットワーク変化の原因にお

いても、動物実験の結果と同様な結果になった事から、新生ニューロンが関与している可能性があるのではないかと推測される。この事から、本研究で発見した放射線照射による海馬ネットワーク変化はヒトにおける新生ニューロン研究のバイオマーカーとして応用できるのではないかと考えている。ヒトにおける新生ニューロンの研究は難しい事から、どの研究グループにおいても、ヒトにおける新生ニューロンの研究手法の探索を行っている (Manganas et al., 2007; Pereira et al., 2007)。本研究の発見はその研究手法の一つとして期待される。さらに、研究手法だけではなく、治療の評価方法にも応用できるのではないかと考えている。アルツハイマー病などの認知症においても、新生ニューロンの関与が報告されている事から (Rockenstein et al., 2006)、アルツハイマー病等の認知症における治療の評価にも応用が可能ではないかと考えている。

本研究は放射線照射の副作用改善や認知症の治療だけでなく、新生ニューロンの基礎研究にも大きな貢献が期待される。海馬ネットワークにおける新生ニューロンの役割や存在意義について、明確な定義付けがされていない。本研究の内容から、新生ニューロンは DG から CA3 への信号伝達に大きく関与しているのではないかと推測される。また、他の研究グループから、新生ニューロンは成熟ニューロンと比べ、発火の閾値、強度、パターンが違う事が報告されている事から (Ge et al., 2008; Toni et al., 2008; Mongiant et al., 2009; Lacefield et al., 2012)、新生ニューロンは成熟ニューロンより、優先的に信号を受け取り、CA3 領域に信号を伝達する事に貢献しているのではないかと考えられる。本研究で得られた結果は、他の研究グループからの結果と合わせて、海馬ネットワークにおける新生ニューロンの役割や存在意義についての定義化に大きな貢献ができるのではないかと考えている。

さらに、DG-CA3 間のネットワークだけではなく、新生ニューロンと海馬外の領域に存在するニューロンとの関係を見た時、その時における新生ニューロンの存在意義についても詳しく分かっていない。新生ニューロンと他の領域に存在するニューロンとの関係に関して、中隔野や前頭前野のニューロンに関する報告が幾つかある (Kaneko et al., 2006; Itou et al., 2010; Rapanelli et al., 2011)。しかし、fMRI 等のネットワーク解析を行い、新生ニューロンと他の領域との関係を報告した論文は無い。本研究の発見は、fMRI を用いて新生ニューロンと他の領域 (前頭前野と中隔野)における関係性を初めて示した知見である。DG から前頭前野や中隔野に信号を送信するためには、必ず DG から CA3 に信号を送り、CA3 や CA1 を介して前頭前野や中隔野に信号が送信される。そのため、新生ニューロンの影響を受けやすいと考えられる。この事から、新生ニューロンは DG-CA3 間の信号伝達を調節するだけではなく、海馬外への信号伝達も調節しているのではないかと考えられる。これらの事から、本研究で得られた結果は、海馬内のネットワークや海馬外のネットワークにおいて、新生ニューロンがどのように寄与しているかを考えるための新しい知見になるのではないかと考えられる。

最後に、本研究における不足事項と今後の実験の必要性について述べる。一つ目は、動

動物実験において海馬ネットワークの経時的な変化を評価していない事である。臨床研究では、放射線治療 1 ヶ月後と 4 ヶ月後における海馬ネットワークの経時的な変化を評価している事に対して、動物実験では、放射線照射 4 ヶ月後の海馬ネットワーク変化を評価していない。本研究で構築した MRI 装置におけるサンプルを入れるスペースの狭さから、放射線照射 4 ヶ月後のマウス海馬ネットワーク変化を評価する事が出来なかった。動物実験においても、臨床研究と同様に、放射線照射 4 ヶ月の海馬ネットワーク変化を評価する必要がある。さらに、今後の研究において、マウスを用いた実験では rsfMRI による海馬ネットワークの経時的な変化を評価するだけではなく、Opto-fMRI による海馬神経活動の経時的な変化を評価する事で、放射線照射による神経伝達の影響を評価する必要があると考えられる。二つ目は、NPC 患者の年齢とマウスの週齢に違いがある事である。動物実験では 1 週齢の若いマウスに放射線を照射して実験を行った。臨床研究では平均年齢 47 歳の患者をリクルートした。放射線に対する感受性の違いや加齢に伴う脳機能低下が報告されている事から(Andrews-Hanna et al., 2007)、動物実験においても、幼若マウスではなく、成体マウスを用いた実験が必要である。三つ目は、動物実験において fMRI 撮像を行うために、EPI 法ではなく FLASH 法を用いた事である。FLASH 法より EPI 法の方が BOLD 信号を強く捉えられる事から、fMRI 撮像は EPI 法を用いる事が一般的である。今後の研究においても、本研究で構築した MRI 装置の改善を行い、EPI 法による fMRI 撮像を行う事が課題である。4 つ目は放射線照射には非特異的な影響である。頭部への放射線照射による影響は複数あり、その一つに新生ニューロンの低下が挙げられる。本研究は新生ニューロンに着目して研究を進めたが、本研究で発見した放射線照射による海馬ネットワーク変化の原因が新生ニューロンである事を完全には証明出来ていない。これを証明するためには、新生ニューロン特異的に神経活動を抑制したトランスジェニックマウスを用いて、同様な fMRI 実験を行う必要がある。

以上の事から、本研究では、頭部への放射線照射により認知機能障害が起こっている時、海馬内外ネットワークに障害が起こる事を発見した。この発見は放射線治療による副作用の改善だけではなく、新生ニューロンの基礎研究や、他の認知症に対する治療にも貢献できると考えている。

## 参考文献

- Altaman J, Das GD. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Comp Neurol.* 124:319-335
- Amador A, Elliott J, Miller A, Ginbey A, Pazour G, Enikolopov G, Roberts A, Tersikh A (2011) Primary cilia regulate proliferation of amplifying progenitors in adult hippocampus: Implications for learning and memory. *J Neurosci* 31 (27): 9933-9944.
- Amaral DG (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *Comp Neurol.* 15:851-914.
- Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL (2007) Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron* 56 (5): 924-935.
- Angenstein F, Kammerer E, Scheich H (2009) The BOLD response in the rat hippocampus depends rather on local processing of signals than on the input or output activity. A combined functional MRI and electrophysiological study. *J Neurosci* 29:2428-2439.
- Angenstein F, Kammerer E, Niessen HG, Frey JU, Scheich H, Frey S (2007) Frequency-dependent activation pattern in the rat hippocampus, a simultaneous electrophysiological and fMRI study. *Neuroimage* 38:150-163.
- Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng GP (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54:205-218.
- Bailey ME, Wang AC, Hao J, Janssen WG, Hara Y, Dumitriu D, Hof PR, Morrison JH (2011) Interactive effects of age and estrogen on cortical neurons: implications for cognitive aging. *Neuroscience* 191:148-58.
- Balachandar, R., John, L.P., Saini, J., Kumar, K.J., Joshi, H., Sadanand, S., Aiyappan, S., Sivakumar, S., Loganathan, M., Verghese, M., Bharath, S (2014) A study of structural and functional connectivity in early Alzheimer's disease using rest fMRI and diffusion tensor imaging. *Int J Geriatr Psychiatry.*
- Beeman CL, Bauer PS, Pierson JL, Quinn JJ (2013) Hippocampus and medial prefrontal cortex contributions to trace and contextual fear memory expression over time. *Learn Mem*

20:336-343.

- Biedermann S, Fuss J, Zheng L, Sartorius A, Falfan-Melgoza C, Demirakca T, Gass P, Ende G, Weber-Fahr W (2012) In vivo voxel based morphometry: Detection of increased hippocampal volume and decreased glutamate levels in exercising mice. *Neuroimage* 61:1206-1212.
- Biswal B, Yetkin FZ, Haughton VM, Hyde JS (1995) Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med* 34:537-541.
- Bizon JL, Gallagher M (2003) Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci* 18:215-219.
- Burghardt NS, Park EH, Hen R, Fenton AA (2012) Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus* 22:1795-1808.
- Canals S, Beyerlein M, Murayama Y, Logothetis NK (2008) Electric stimulation fMRI of the perforant pathway to the rat hippocampus. *Magn Reson Imag* 26:978-986.
- Cao X, Liu Z, Xu C, Li J, Gao Q, Sun N, Xu Y, Ren Y, Yang C, Zhang K (2012) Disrupted resting-state functional connectivity of the hippocampus in medication-naive patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* 141:194-203.
- Cenquizca LA, Swanson LW (2007) Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:1-26.
- Chan KC, Khong PL, Cheung MM, Wang SL, Cai KX, Wu EX (2009) MRI of late microstructural and metabolic alterations in radiation-induced brain injuries. *J Magn Reson Imag* 29:1013-1020.
- Chebrolu H, Slevin JT, Gash DA, Gerhardt GA, Young B, Given CA, Smith CD (2006) MRI volumetric and intensity analysis of the cerebellum in Parkinson's disease patients infused with glial-derived neurotrophic factor (GDNF). *Exp Neurol* 198:450-456.
- Chen J, Dassarith M, Yin Z, Liu H, Yang K, Wu G (2011) Radiation induced temporal lobe necrosis in patients with nasopharyngeal carcinoma: a review of new avenues in its management. *Radiat Oncol* 6: 1-8.



- Cheung MC, Chan AS, Law SC, Chan JH, Tse VK (2003) Impact of radionecrosis on cognitive dysfunction in patients after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 97:2019-2026.
- Chin Y, Kishi M, Sekino M, Nakajo F, Abe Y, Terazono Y, Hiroyuki O, Kato F, Koizumi S, Gachet C, Hisatsune T (2013) Involvement of glial P2Y<sub>1</sub> receptors in cognitive deficit after focal cerebral stroke in a rodent model. *J Neuroinflammation* 95:1-12.
- Conklin HM, Ashford JM, Howarth RA, Merchant TE, Ogg RJ, Santana VM, Reddick WE, Wu S, Xiong X (2012) Working memory performance among childhood brain tumor survivors. *J Int Neuropsychol Soc* 18:996-1005.
- Cornwell BR, Johnson LL, Holroyd T, Carver FW, Grillon C (2008) Human hippocampal and parahippocampal theta during goal-directed spatial navigation predicts performance on a virtual Morris water maze. *J Neurosci* 28:5983-5990.
- Cosottini M, Pesaresi I, Piazza S, Diciotti S, Cecchi P, Fabbri S, Carlesi C, Mascalchi M, Siciliano G (2012) Structural and functional evaluation of cortical motor areas in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp Neurol* 234:169-180.
- DeAngelis LM, Delattre JY, Posner JB (1989) Radiation-induced dementia in patients cured of brain metastases. *Neurology* 39(6):789-96.
- Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenbock G, Ting A, Schnitzer MJ (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci* 26:10380-10386.
- Deng W, Saxe MD, Gallina IS, Gage FH (2009) Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci* 29:13532-13542.
- Denny CA, Burghardt NS, Schachter DM, Hen R, Drew MR (2012) 4-to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22:1188-1201.
- Desai M, Kahn I, Knoblich U, Bernstein J, Atallah H, Yang A, Kopell N, Buckner RL, Graybiel AM, Moore CI, Boyden ES (2011) Mapping brain networks in awake mice using combined optical neural control and fMRI. *J Neurophysiol* 105:1393-1405.

- Doetsch F, Hen R (2005) Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 15:121-128.
- Dranovsky A, Picchini AM, Moadel T, Sisti AC, Yamada A, Kimura S, Leonardo ED, Hen R (2011) Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron* 70: 908-922.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14385-14390.
- Fuss J, Ben Abdallah NMB, Hensley FW, Weber K-J, Hellweg R, Gass P (2010) Deletion of running-induced hippocampal neurogenesis by irradiation prevents development of an anxious phenotype in mice. *Plos One* 5: 1-9.
- Fuss J, Biedermann SV, Falfan-Melgoza C, Auer MK, Zheng L, Steinle J, Hoerner F, Sartorius A, Ende G, Weber-Fahr W, Gass P (2014) Exercise boosts hippocampal volume by preventing early age-related gray matter loss. *Hippocampus* 24:131-134.
- Gazdzinski LM, Cormier K, Lu FG, Lerch JP, Wong CS, Nieman BJ (2012) Radiation-induced alterations in mouse brain development characterized by magnetic resonance imaging. *Int J Radia Oncol Biol Phys* 84:631-638.
- Gee DG, Biswal BB, Kelly C, Stark DE, Margulies DS, Shehzad Z, Uddin LQ, Klein DF, Banich MT, Castellanos FX, Milham MP (2011) Low frequency fluctuations reveal integrated and segregated processing among the cerebral hemispheres. *Neuroimage* 54:517-27.
- Ge S, Sailor KA, Ming G-l, Song H (2008) Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol* 586:3759-3765.
- Ge S, Yang C-h, Hsu K-s, Ming G-l, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559-566.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918-934.
- Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM (2013) The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? *Eur Neuropsychopharmacol* 23:1165-1181.

- Gouliamos AD, Athanassopoulou A, Mouloupoulou L, Kalovidouris A, Kotoulas G, Liaou A, Vlahos L, Papavassiliou C (1996) MRI of nasopharyngeal carcinoma metastatic to the cerebellopontine angle. *Neuroradiology* 38:375-377.
- Goveas JS, Xie C, Ward BD, Wu Z, Li W, Franczak M, Jones JL, Antuono PG, Li SJ (2011) Recovery of hippocampal network connectivity correlates with cognitive improvement in mild Alzheimer's disease patients treated with donepezil assessed by resting-state fMRI. *J Magn Reson Imaging* 34:764-73.
- Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, Goshen I, Thompson KR, Deisseroth K (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141:154-165.
- Greene-Schloesser D, Robbins ME (2012) Radiation-induced cognitive impairment-from bench to bedside. *Neuro Oncol* 14:37-44.
- Hahn K, Myers N, Prigarin S, Rodenacker K, Kurz A, Foerstl H, Zimmer C, Wohlschlaeger AM, Sorg C (2013) Selectively and progressively disrupted structural connectivity of functional brain networks in Alzheimer's disease - Revealed by a novel framework to analyze edge distributions of networks detecting disruptions with strong statistical evidence. *Neuroimage* 81:96-109.
- Hidalgo-Tobon SS (2010) Theory of gradient coil design methods for magnetic resonance imaging. *Concepts Magn Reson Part A* 36A:223-242.
- Hsu MM, Tu SM (1983) Nasopharyngeal carcinoma in Taiwan – clinical manifestations and results of therapy. *Cancer* 52:362-368.
- Hyare H, Wisco JJ, Alusi G, Cohen M, Nabili V, Abemayor E, Kirsch CF (2010) The anatomy of nasopharyngeal carcinoma spread through the pharyngobasilar fascia to the trigeminal mandibular nerve on 1.5 T MRI. *Surg Radiol Anat* 32:937-44.
- Ide Y, Fujiyama F, Okamoto-Furuta K, Tamamaki N, Kaneko T, Hisatsune T (2008) Rapid integration of young newborn dentate gyrus granule cells in the adult hippocampal circuitry. *European J Neurosci* 28:2381-2392.

- Itou Y, Nochi R, Kuribayashi H, Saito Y, Hisatsune T (2011) Cholinergic activation of hippocampal neural stem cells in aged dentate gyrus. *Hippocampus* 21:446-459.
- Jiang HY, van Zijl PCM, Kim J, Pearlson GD, Mori S (2006) DtiStudio: Resource program for diffusion tensor computation and fiber bundle tracking. *Comput Methods Programs Biomed* 81: 106-116.
- Kaneko N, Okano H, Sawamoto K (2006) Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes Cells* 11:1145-1159.
- Kahn I, Desai M, Knoblich U, Bernstein J, Henninger M, Graybiel AM, Boyden ES, Buckner RL, Moore CI (2011) Characterization of the functional MRI response temporal linearity via optical control of neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 31:15086-15091.
- Kerbler GM, Hamlin AS, Pannek K, Kurniawan ND, Keller MD, Rose SE, Coulson EJ (2013) Diffusion-weighted magnetic resonance imaging detection of basal forebrain cholinergic degeneration in a mouse model. *Neuroimage* 66:133-141.
- Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Sekiguchi M, Sugiyama H, Inokuchi K (2009) Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139:814-827.
- Kronmüller KT, Schröder J, Köhler S, Götz B, Victor D, Unger J, Giesel F, Magnotta V, Mundt C, Essig M, Pantel J (2009) Hippocampal volume in first episode and recurrent depression. *Psychiatry Res* 30:62-66.
- Kumar M, Haridas S, Trivedi R, Khushu S, Manda K (2013) Early cognitive changes due to whole body gamma-irradiation: A behavioral and diffusion tensor imaging study in mice. *Exp Neurol* 248:360-368.
- Lacefield CO, Itskov V, Reardon T, Hen R, Gordon JA (2012) Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus* 22:106-116.
- Le Bihan D, Mangin JF, Poupon C, Clark CA, Pappata S, Molko N, Chabriat H (2001) Diffusion tensor imaging: Concepts and applications. *J Magn Reson Imag* 13:534-546.

- Lee JH, Durand R, Gradinaru V, Zhang F, Goshen I, Kim D-S, Fenno LE, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2010) Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring. *Nature* 465:788-792.
- Li J, Bentzen SM, Li J, Renschler M, Mehta MP (2008) Relationship between neurocognitive function and quality of life after whole-brain radiotherapy in patients with brain metastasis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71:64-70.
- Lv X-F, Zheng X-L, Zhang W-D, Liu L-Z, Zhang Y-M, Chen M-Y, Li L (2014) Radiation-induced changes in normal-appearing gray matter in patients with nasopharyngeal carcinoma: a magnetic resonance imaging voxel-based morphometry study. *Neuroradiology* 56:423-430.
- Mabbott DJ, Monsalves E, Spiegler BJ, Bartels U, Janzen L, Guger S, Laperriere N, Andrews N, Bouffet E (2011) Longitudinal evaluation of neurocognitive function after treatment for central nervous system germ cell tumors in childhood. *Cancer* 117:5402-5411.
- Manganas LN, Zhang X, Li Y, Hazel RD, Smith SD, Wagshul ME, Henn F, Benveniste H, Djuric PM, Enikolopov G, Maletic-Savatic M (2007) Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318:980-985.
- Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70-74.
- Mohns EJ, Blumberg MS (2008) Synchronous bursts of neuronal activity in the developing hippocampus: modulation by active sleep and association with emerging gamma and theta rhythms. *J Neurosci* 28:10134-10144.
- Mongiati LA, Esposito MS, Lombardi G, Schinder AF (2009) Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *Plos One* 4: 1-9.
- Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD (2002) Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* 8:955-962.
- Nair G, Duong TQ (2004) Echo-planar BOLD fMRI of mice on a narrow-bore 9.4 T magnet. *Magn Reson Med* 52:430-4.
- Nasrallah FA, Tay HC, Chuang KH (2014) Detection of functional connectivity in the resting mouse

brain. *Neuroimage* 86:417-24.

- Ogawa S, Lee TM, Nayak AS, Glynn P (1990) Oxygenation-sensitive contrast in magnetic-resonance imaging of rodent brain at high magnetic-fields. *Magn Reson Med* 14:68-78.
- Ong KC, Wen H, Chesnick AS, Duewell S, Jaffer FA, Balaban RS (1995) Radiofrequency shielding of surface coils at 4.0T. *J Magn Reson Imag* 5: 773-777.
- Panagiotakos G, Alshamy G, Chan B, Abrams R, Greenberg E, Saxena A, Bradbury M, Edgar M, Gutin P, Tabar V (2007) Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain. *PLoS One* 2: 1-13.
- Peissner W, Kocher M, Treuer H, Gillardon F (1999) Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 71:61-68.
- Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA (2007) An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5638-5643.
- Qi R, Xu Q, Zhang LJ, Zhong J, Zheng G, Wu S, Zhang Z, Liao W, Zhong Y, Ni L, Jiao Q, Zhang Z, Liu Y, Lu G (2012) Structural and functional abnormalities of default mode network in minimal hepatic encephalopathy: A study combining DTI and fMRI. *Plos One* 7, 1-9.
- Raber J, Villasana L, Rosenberg J, Zou Y, Huang TT, Fike JR (2011) Irradiation enhances hippocampus-dependent cognition in mice deficient in extracellular superoxide dismutase. *Hippocampus* 21:72-80.
- Rapanelli M, Frick LR, Zanutto BS (2011) Learning an operant conditioning task differentially induces gliogenesis in the medial prefrontal cortex and neurogenesis in the hippocampus. *PLoS One* 6:1-12
- Rivera PD, Shih H-Y, LeBlanc JA, Cole MG, Amaral WZ, Mukherjee S, Zhang S, Lucero MJ, DeCarolis NA, Chen BPC, Eisch AJ (2013) Acute and fractionated exposure to high-LET Fe-56 HZE-particle radiation both result in similar long-term deficits in adult hippocampal neurogenesis. *Radiat Res* 180:658-667.

- Rockenstein E, Mante M, Adame A, Crews L, Moessler H, Masliah E (2006) Effects of cerebrolysin on neurogenesis in an APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 113:265-75.
- Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, VandenBerg SR, Morhardt DR, Fike JR (2004) Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol* 188:316-330.
- Roland JJ, Stewart AL, Janke KL, Gielow MR, Kostek JA, Savage LM, Servatius RJ, Pang KCH (2014) Medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) GABAergic regulation of hippocampal acetylcholine efflux is dependent on cognitive demands. *J Neurosci* 34:506-514.
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472:466-470.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang J-W, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia ADR, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17501-17506.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Tada E, Parent JM, Lowenstein DH, Fike JR (2000) X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience* 99:33-41.
- Tang Y, Luo D, Rong X, Shi X, Peng Y (2012) Psychological disorders, cognitive dysfunction and quality of life in nasopharyngeal carcinoma patients with radiation-induced brain injury. *Plos One* 7: 1-6.
- Taphoorn MJB, Klein M (2004) Cognitive deficits in adult patients with brain tumors. *Lancet Neurol* 3:159-168.
- Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, Isago H, Sugiyama Y, Hiroi T, Ishizuka T, Mushiake H, Kato M, Hirabayashi M, Shigemoto R, Yawo H, Tamai M (2009) Visual properties of transgenic rats harboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the Thy-1.2 promoter. *Plos One* 4: 1-9.

- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901-907.
- Trivedi R, Khan AR, Rana P, Haridas S, Kumar BSH, Manda K, Rathore RKS, Tripathi RP, Khushu S (2012) Radiation-induced early changes in the brain and behavior: Serial diffusion tensor imaging and behavioral evaluation after graded doses of radiation. *J Neurosci Res* 90:2009-2019.
- Tsui EYK, Chan JHM, Ramsey RG, Leung TW, Cheung YK, Luk SH, Lai KF, Wong KPC, Fong D, Yuen MK (2001) Late temporal lobe necrosis in patients with nasopharyngeal carcinoma: evaluation with combined multi-section diffusion weighted. and perfusion weighted MR imaging. *Eur J Radiol* 39:133-138.
- Tsurugizawa T, Uematsu A, Uneyama H, Torii K (2010) Effects of isoflurane and alpha-chloralose anesthesia on BOLD fMRI response to ingested-glutamate in rats. *Neuroscience* 165:244-251.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427-31.
- Wang S, Wu EX, Qiu D, Leung LHT, Lau H-F, Khong P-L (2009) Longitudinal diffusion tensor magnetic resonance imaging study of radiation-induced white matter damage in a rat model. *Cancer Res* 69:1190-1198.
- Wang S, Qiu D, So K-F, Wu EX, Leung LHT, Gu J, Khong P-L (2013) Radiation induced brain injury: assessment of white matter tracts in a pre-clinical animal model using diffusion tensor MR imaging. *J Neurooncol* 112:9-15.
- Weaver KE, Richards TL, Liang O, Laurino MY, Samil A, Aylward EH (2009) Longitudinal diffusion tensor imaging in Huntington's Disease. *Exp Neurol* 216:525-529.
- Williams KA, Magnuson M, Majeed W, LaConte SM, Peltier SJ, Hu X, Keilholz SD (2010) Comparison of alpha-chloralose, medetomidine and isoflurane anesthesia for functional connectivity mapping in the rat. *Magn Reson Imag* 28:995-1003.



Xie P, Yu T, Fu X, Tu Y, Zou Y, Lui S, Zhao X, Huang X, Kemp GJ, Gong Q (2013) Altered functional connectivity in an aged rat model of postoperative cognitive dysfunction: A study using resting-state functional MRI. *Plos One* 8; 1-7.

Xiong WF, Qiu SJ, Wang HZ, Lv XF (2013) 1H-MR spectroscopy and diffusion tensor imaging of normal-appearing temporal white matter in patients with nasopharyngeal carcinoma after irradiation: Initial experience. *J Magn Reson Imag* 37:101-108.

Yan H, Tian L, Yan J, Sun W, Liu Q, Zhang Y-B, Li X-M, Zang Y-F, Zhang D (2012) Functional and anatomical connectivity abnormalities in cognitive division of anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Plos One* 7: 1-9.

Zhao CM, Teng EM, Summers RG, Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience* 26:3-11.

Zhou Y, Shu N, Liu Y, Song M, Hao Y, Liu H, Yu C, Liu Z, Jiang T (2008) Altered resting-state functional connectivity and anatomical connectivity of hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res* 100:120-32.

今岡遼太 2012 年修士論文「放射線照射マウスにおける海馬依存的な認知機能の障害とその回復について」

## 略語一覧

本論文中に使用した略語についてアルファベット順にまとめた。

- ・ BOLD (blood oxygenation level-dependent)

fMRI により得られる MRI 信号または、fMRI の原理でもある BOLD 効果を指す。

- ・ BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)

チミジン類似物質。細胞周期 S 期において DNA に取り込まれるため、分裂細胞を標識するために利用される細胞マーカーである。

- ・ CA1 (cornu ammonis 1)

海馬内のアンモン角の一部。

- ・ CA3 (cornu ammonis 3)

海馬内のアンモン角の一部。

- ・ ChR2 (Channelrhodopsin 2)

Light-gated cation channel であり、光刺激によりチャンネルを開口し、陽イオンを細胞内に流入させるチャンネル。この ChR2 を神経細胞に発現させ、光刺激による神経細胞を操作する技術を Optogenetics と呼ぶ。

- ・ DAPI (4' 6-diamidino-2-phenylindole)

紫外光で励起する蛍光色素で、細胞膜透過性があり核内に取り込まれる。本研究では海馬歯状回の顆粒細胞層 (GCL) を可視化する目的で使用した。

- ・ DG (dentate gyrus)

海馬歯状回。新生ニューロンが存在する領域。

- ・ DMN (default mode network)

Resting state network の一つであり、認知機能に関与しているネットワークである。加齢やアルツハイマー病等による認知機能障害が起こる時、DMN が減少する事が有名である。DMN には主に後部帯状回 (PCC)、前頭前野内側部 (mPFC)、下頭頂小葉 (IPL) の 3 領域からなるネットワークである。

- **DWI (diffusion weighted image)**

水の拡散を画像化したもの。本研究では解剖画像として使用した。

- **DTI (diffusion tensor imaging)**

DWI に 6 軸以上の傾斜磁場を印加し、水の拡散情報を画像化する技術。本研究では FA の解析を行った。

- **EPI(echo planner imaging)**

fMRI を行う MRI シークエンスの一つ。FLASH シークエンスより高速撮像が可能であり、さらに BOLD 信号の感受性が高い撮像方法。

- **FA (fractional anisotropy)**

DTI 解析の一つ。水の拡散の方向性を画像化した。本研究では神経線維の構造変化の評価に用いた。

- **FC (functional connectivity)**

ネットワークの機能的な繋がり的事。コネクションの強さを示す。また、rsfMRI 解析の一つに FC 解析がある。ROI を置いた領域との LFF の同調率をマップ化する事で、FC を見る事が出来る。

- **FID (Free Induction Decay)**

自由誘導減衰。RF パルスにより励起したプロトンの信号を示す。この信号は徐々に減衰していく。

- **FLASH (fast low-angle shot)**

fMRI を行う MRI シークエンスの一つ。グラジエントエコー法を改善した高速撮像法。

- **fMRI (functional magnetic resonance imaging)**

脳神経活動を測定できる MRI 測定法の一つ。

- **GCL (granular cell layer)**

顆粒細胞層。特に本研究では海馬歯状回の顆粒細胞層を示す。

- **GM (gray matter)**

灰白室。脳内で神経細胞の細胞体が多く集まっている領域。

- IPL (inferior parietal lobule)

下頭頂小葉。DMN の領域の一つである。

- LFF (low frequency fluctuation)

rsfMRIにより見ている神経活動は0.01-0.08 Hzにある低い周波数をもった神経活動により表せる。

- MRI (magnetic resonance imaging)

核磁気共鳴現象を利用した脳画像イメージング技術。

- NeuN (neuronal nuclei antigen)

主に成熟ニューロンに発現している核内タンパク質。成熟ニューロンのマーカーとして使用される。

- NMR (nuclear magnetic resonance)

核磁気共鳴現象。

- NPC (nasopharyngeal carcinoma)

上咽頭がん。

- Opto-fMRI (Optogenetics-functional MRI)

光刺激により活性化させた神経活動を fMRI により解析する MRI 技術の一つ。本研究では海馬の神経活動をこの技術により解析した。

- PCC (posterior cingulate cortex)

後部帯状回。DMN の領域の一つである。

- PFC (prefrontal cortex)

前頭前野。脳領域において、前方の領域にあたる。認知機能に関係がある領域である。

- PBS (phosphate buffered saline)

リン酸緩衝生理食塩水。

- RF (radio frequency)

ここでは MRI 信号を励起、受信する RF コイルを指す。または MRI 信号を励起させる RF パルスを示す。

- ・ ROI (region of interest)

MRI 解析を行うための関心領域。

- ・ rsfMRI (resting state functional magnetic resonance imaging)

安静時に撮像を行う fMRI 技術。コネクション解析が可能である。

- ・ SGZ (subgranular zone)

海馬歯状回顆粒細胞最内層。成体脳における神経新生が認められている領域。

- ・ SNR (signal noise ratio)

信号ノイズ比。この SNR が高い程、ノイズが小さく MRI 画像の質が高い事を示す。

- ・ SPM (statistical parametric mapping)

fMRI 解析ソフト。世界中の fMRI 研究で多様されている。

- ・ SVZ (subventricular zone)

側脳室下帯。成体脳における神経新生が認められている領域。

- ・ TBS (tris buffered saline)

トリス緩衝生理食塩水。

- ・ TE (echo time)

RF パルスを印加し MRI 信号を誘導してから、MRI 信号を受信するまでの時間。

- ・ TR (repetition time)

RF パルスを印加してから、次の RF パルスを印加するまでの時間。

- ・ tpm (tissue probability map)

fMRI 解析と VBM 解析の際に用いる segment の項目で使用する画像。segment の template となり、GM と WM がその領域に存在する確立をマップ化した画像。

- ・ T1WI (T1 weighted image)

T1 強調画像。MR シグナルの縦緩和(T1 緩和)を強調した画像。本研究では解剖画像として使用した。脂肪・骨髄、筋肉、血液・脳組織・骨の順に高いシグナルが得られる(画像で見ると白くなる)。

- T2WI (T2 weighted image)

T2 強調画像。MR シグナルの横緩和(T2 緩和)を強調した画像。本研究では解剖画像として使用した。血液・脳組織、脂肪・筋肉、骨髄・骨の順に高いシグナルが得られる(画像で見ると白くなる)。

- VBM (voxel-based morphometry)

MRI 解析手法の一つ。脳内の体積を比較する事ができる。

- WM (white matter)

白質。脳内で神経線維が多く集まっている領域。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、5年間とても熱意のある指導をしてくださった東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻細胞応答化学分野の久恒辰博准教授に心から感謝いたします。研究テーマの立案や実験の遂行、論文の執筆にあたり多くの事を学ぶ事が出来ました。

NPC 患者を用いた研究において、患者のリクルート、治療、そして MRI 撮像を行って頂いた、高雄医科大学 (台湾)の Sharon Chia-Ju Cen 先生、Shi-Long Lian 先生、Chin-Jen Huang 先生には心から感謝いたします。また、この共同研究を発案して頂きました国立がん研究センター・臨床開発センター・機能診断開発分野の藤井博史先生には深く感謝の意を表します。

MRI 研究の指導をしてくださった東京大学大学院工学系研究科電気系工学専攻の関野正樹准教授に心から感謝いたします。MRI の使い方や知識など多くの事を学ぶ事が出来ました。また MRI を用いるにあたり、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端エネルギー工学専攻大崎研究室の皆様含め、大崎博之教授に深く感謝の意を表します。

トランスジェニックラットの作成および提供して頂きました福井大学医学部の深澤有吾博士及び、東北大学大学院生命科学研究科の八尾寛教授に深く感謝の意を表します。

ラットやマウスの放射線照射における指導をしてくださった東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻動物生殖システム分野の三谷啓志教授及び尾田正二准教授に深く感謝の意を表します。

様々な助言を下された本研究室の卒業生や先輩方、そして仲間と在学生にも深く感謝の意を表します。

生活面で経済的なサポートをして頂いた家族に深く感謝いたします。実験で使用した数々の動物に感謝するとともに冥福を祈ります。最後に本研究を行うにあたり、関わった全ての人達に感謝いたします。

2015年2月  
阿部欣史